

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof Dr.med. Steffen Massberg

# **Perizyten als Leitstrukturen der interstitiellen Leukozytenmigration bei steriler Inflammation**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-  
Maximilians-Universität zu München

Von Selgai Haidari

aus Marburg

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Steffen Massberg

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andrej Khandoga

Priv.Do. Dr. Gerald Schmid

Prof. Dr. Karl-Hans Englmeier

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. Konstantin Gregor Stark

Dekan: Prof. Dr.med.dent R. Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2016

**Meinen Eltern  
und  
Großeltern**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Pathogenese der sterilen Inflammation</b>	<b>2</b>
2.1.1	Die Rolle von DAMPs und Pattern Recognition Receptors	2
2.1.2	Funktion inflammatorischer Mediatoren bei steriler Inflammation mit Fokus auf MIF	4
2.1.3	Ablauf der Entzündungskaskade bei steriler Inflammation	8
2.1.4	Das angeborene Immunsystem bei steriler Inflammation	9
2.1.4.1	Monozyten	9
2.1.4.2	Neutrophile Granulozyten	10
2.1.5	Die Phasen der Rekrutierungs von myeloiden Leukozyten zu inflammatorischen Prozessen	10
2.1.6	Physiologie der interstitiellen Leukozytenmigration	12
<b>2.2</b>	<b>Die Bedeutung von Perizyten bei Entzündungsprozessen</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Maus als Versuchstier</b>	<b>20</b>
4.1.1	Haltung und Zucht	20
4.1.2	Tierstämme	21
4.1.3	NG2DsRed	21
4.1.4	LysM-eGFP	21
4.1.5	CX <sub>3</sub> CR1	22
4.1.6	Erstellen von Knochenmarkchimären	22
4.1.7	Bestrahlung	22
4.1.8	Präparation des Knochenmarks	23
4.1.9	Schwanzveneninjektion	24
<b>4.2</b>	<b>Die 2-Photonen Mikroskopie</b>	<b>24</b>
4.2.1	Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie	24
4.2.2	Multiphotonen- und lineare Fluoreszenzmikroskopie	25
4.2.3	Aufbau eines Zwei-Photonen-Mikroskops	26
4.2.4	Vorteile der Zwei-Photonen Mikroskopie im Vergleich zur herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie	27
4.2.5	Second Harmonic Generation	28
<b>4.3</b>	<b>Durchführung der 2 Photonenmikroskopie</b>	<b>28</b>
4.3.1	Narkose der Maus	29
4.3.2	Femoraliskatheter	29



4.3.3	Ohrmodell .....	31
<b>4.4</b>	<b>Modelle zur Induktion einer sterilen Inflammation .....</b>	<b>32</b>
4.4.1	Injektion chemotaktischer Stoffe .....	32
4.4.2	Laser Verletzung .....	33
<b>4.5</b>	<b>Whole Mount Staining.....</b>	<b>33</b>
<b>4.6</b>	<b>Immunhistologische Färbungen .....</b>	<b>34</b>
4.6.1	Grundlagen der immunhistologischen Färbungen .....	34
4.6.2	Vorbereitung der Immunhistologie .....	34
4.6.2.1	Entnahme der Organe für die Immunhistologie .....	34
4.6.2.2	Herstellung der Gefrierschnitte .....	34
4.6.3	Durchführung der Immunhistologie.....	34
<b>4.7</b>	<b>Parameter zur interstitiellen Migration .....</b>	<b>35</b>
4.7.1	Track Length .....	36
4.7.2	Displacement.....	36
4.7.3	Velocity .....	36
4.7.4	Track Velocity.....	36
4.7.5	Meandering Index .....	37
4.7.6	Displacement Rate .....	37
4.7.7	Mean Displacement Plot .....	37
4.7.8	Motility Coefficient.....	38
4.7.9	Autotracking.....	39
4.7.10	Heatmap .....	39
4.7.11	Overlap Coefficient .....	39
4.7.12	Time to Target .....	40
4.7.13	Statistische Auswertung.....	40
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1</b>	<b>Lokalisation der Perizyten in der NG2DsRed Maus .....</b>	<b>41</b>
<b>5.2</b>	<b>Interaktion zwischen Perizyten und myeloiden Leukozyten bei interstitieller Migration .....</b>	<b>42</b>
<b>5.3</b>	<b>Vermittlung der Adhäsion der myeloiden Leukozyten mit NG2<sup>+</sup> Perizyten durch ICAM-1 .....</b>	<b>46</b>
<b>5.4</b>	<b>Chemotaktische Wirkung von NG2<sup>+</sup> Perizyten auf myeloide Leukozyten .....</b>	<b>48</b>
<b>5.5</b>	<b>Expression von MIF durch NG2<sup>+</sup> Perizyten .....</b>	<b>55</b>
<b>5.6</b>	<b>Bedeutung von MIF für chemotaktische Wirkung von NG2<sup>+</sup> Perizyten auf myeloide Leukozyten.....</b>	<b>57</b>

5.7	Aktivierung myeloider Leukozyten durch Perizyten bei interstitieller Migration <i>in vivo</i>	60
5.8	Bedeutung von NG2 <sup>+</sup> Perizyten für das interstitielle Migrationsmuster myeloider Leukozyten.....	67
5.9	NG2 <sup>+</sup> Perizyten leiten myeloide Leukozyten mittels MIF .....	75
6	Diskussion .....	86
6.1	Adhäsive Interaktionen zwischen Perizyten und myeloiden Leukozyten vermittelt durch ICAM-1 .....	87
6.2	Perizyten wirken chemotaktisch auf myeloide Leukozyten.....	89
6.3	NG2 <sup>+</sup> Perizyten fördern die interstitielle Migration myeloider Leukozyten mittels MIF	91
6.4	Ausblick .....	95
7	Zusammenfassung .....	96
8	Summary.....	97
9	Abkürzungsverzeichnis .....	98
10	Abbildungsverzeichnis.....	101
11	Tabellenverzeichnis.....	105
12	Literaturverzeichnis .....	106
13	Danksagung .....	112

## 1 Einleitung

Sterile Inflammation ist eine Entzündungsreaktion, die in Abwesenheit von pathogenen Erregern wie Bakterien oder Viren stattfindet. Dieser Prozess ist die pathophysiologische Grundlage einer Vielzahl klinisch relevanter Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen, Ischämie-Reperfusionsschäden, Arteriosklerose, SIRS und Trauma. Die mit diesen Krankheitsbildern assoziierte Zellnekrose führt durch die unkontrollierte Freisetzung intrazellulärer Bestandteile, die sonst durch die Membranintegrität der Zelle vor dem Erkennen durch das Immunsystem geschützt sind, zu einer Inflammation. Die daraus resultierenden proinflammatorischen Prozesse in den Gefäßen, sowie die darauf folgende Transmigration der Leukozyten durch die Gefäßwand sind bereits in vielen Forschungsarbeiten intensiv untersucht und analysiert worden.

Wenig bekannt ist jedoch welche Prozesse nach Extravasation der myeloiden Leukozyten ins Interstitium stattfinden. Diese sind im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem, vor allem im Lymphknoten, bisher kaum untersucht und verstanden worden. Auch ist unklar, ob andere Zellen auf sterile Inflammationen reagieren und evtl. sogar die interstitielle Migration beeinflussen. Bisher wurde die interstitielle Migration vor allem als ein Prozess begriffen, der primär durch lösliche Chemokine gesteuert wird.

Perizyten sind essentieller Bestandteil der mikrovaskulären Gefäßwand und liegen zwischen dem zirkulierendem Blut und dem Interstitium. Sie verfügen über die Fähigkeit parakrin mit umgebenden Endothelzellen zu kommunizieren. Auch sind sie Teil der Blut-Hirn-Schranke, sie nehmen an ihrer Entwicklung teil, regulieren ihre Permeabilität und beeinflussen so inflammatorische Prozesse. Es wurde gezeigt, dass fibroretikuläre Zellen und anatomische Strukturen im Lymphknoten mit Immunzellen kommunizieren und auch die Migration dieser beeinflussen. Ob Perizyten eine ähnliche Funktion haben und ob sie überhaupt für die interstitielle Migration von Relevanz sind, ist bisher nicht geklärt worden.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Rolle und Wirkung von Perizyten auf die interstitielle Migration von myeloiden Leukozyten bei steriler Inflammation. Es wird der Frage nachgegangen wie Perizyten sterile Inflammation *in vitro* und *in vivo* beeinflussen. Hier spielen vor allem mögliche Interaktionen *in vivo* zwischen myeloiden Leukozyten und Perizyten eine wichtige Rolle. Außerdem soll geklärt werden, ob und wenn ja welche chemotaktischen Stoffe möglicherweise von Perizyten auf myeloide Leukozyten wirken. Mit Hilfe eines Mausmodells werden *in vivo* die Interaktionen zwischen myeloiden Leukozyten und Perizyten bei steriler Inflammation visualisiert und analysiert.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Pathogenese der sterilen Inflammation

Sterile Inflammation definiert sich als ein Entzündungsvorgang, der in Abwesenheit von pathogenen Erregern, wie Bakterien oder Viren stattfindet. Viele medizinisch äußerst relevante Erkrankungen wie der Myokardinfarkt oder Arteriosklerose sind sterile Inflamationsprozesse[1]. Als Reaktion drauf wird im Körper eine Entzündungskaskade initiiert, die den Schaden häufig noch vergrößert[1]. Wie diese Entzündungsreaktion auf zellulärer Ebene abläuft soll im Folgenden erläutert werden.

#### 2.1.1 Die Rolle von DAMPs und Pattern Recognition Receptors

Der Auslöser für die sterile Immunantwort ist die Nekrose von Zellen. Im Gegensatz dazu ist das Absterben von Zellen im Rahmen der Apoptose ein physiologischer Prozess der sich unzählige Male wiederholt ohne dass eine Immunreaktion erfolgt[2]. Der wesentliche Unterschied zwischen Apoptose und Nekrose ist, dass bei der Apoptose die Membranintegrität noch gewährleistet ist[2]. Die apoptotischen Zellen werden anschließend in der Regel phagozytiert, und somit besteht auch nicht die Möglichkeit, dass intrazelluläre Moleküle freigesetzt werden. Bei der Nekrose ist die Membranintegrität nicht mehr vorhanden[2]. Dies hat zur Folge, dass intrazelluläre Stoffe wie ATP, HMGB1, und mitochondriale Bestandteile wie Formylpeptide in den extrazellulären Raum austreten. Diese intrazellulären Stoffe werden auch damage-associated molecular patterns (DAMPs) genannt[1, 3-5].

Zellen des angeborenen Immunsystems verfügen über bestimmte Rezeptoren, die die Detektion der freigesetzten DAMPs ermöglichen und somit auch die Gewebeschädigung. Diese Rezeptoren werden Pattern Recognition Receptors (PPRs) genannt. Wichtige PPRs sind u.a. der FPR1-Rezeptor, welcher der Erkennung von Formyl-Peptiden wie fMLP dient, die in Bakterien und Mitochondrien vorkommen. Der von fMLP ausgehende chemotaktische Effekt wird durch das Zusammenspiel von chemotaktischen Stoffen noch verstärkt[6].

Weitere wichtige Rezeptoren zur Erkennung von DAMPs sind die TLR und NOD-Rezeptoren. Die TLR Rezeptoren sind transmembranäre Rezeptoren, wobei die NOD-

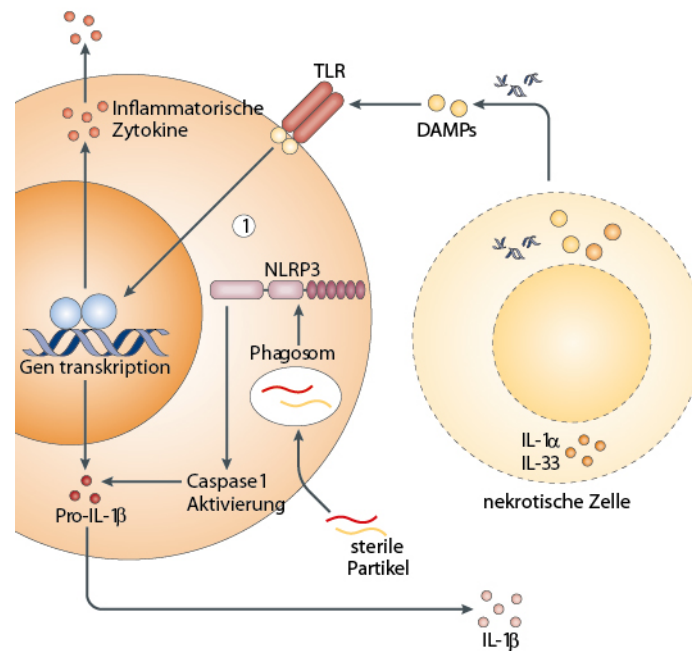
Rezeptoren sich im Plasma befinden[7-9] [10]. Wichtige TL-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems sind TLR 2,4 und 9 die von neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert werden[1, 7]. Bei den NOD-Rezeptoren die ebenfalls von neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert werden ist der (NLRP3) von besonderer Wichtigkeit[1]. Die angesprochenen Rezeptoren reagieren auf unterschiedliche DAMPs, wichtige können aus der Tabelle 1 entnommen werden.

Rezeptoren	Sterile Stimuli
TLR 2	HMGB1, HSP, Versican, Biglycan
TLR 4	HMGB1, HSP, Biglycan, Heperan Sulfate
TLR 9	HMGB1, mitochondriale DNA
NLRP3	ATP, PPD Kristalle (Gicht assoziiert) , Cholesterol Kristalle (Arteriosklerose),

**Tabelle 1: Toll like und NOD Rezeptoren und ihre korrespondierenden sterilen Stimuli**

Wichtige sterile Stimuli und die jeweiligen Rezeptoren, die sie detektieren und über die sie wirken [1].

Kommt es durch Aktivierung der oben genannten DAMPs zu einer Aktivierung eines TL-Rezeptors führt dies zu einer Produktion von proinflammatorischen Cytokinen[2, 10-12]. Ein weiterer Bestandteil der wichtig für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems ist, ist das sogenannte Inflammasom[13]. Das Inflammasom ist ein im Cytosol von neutrophilen Granulozyten und Monozyten befindlicher Multiproteinkomplex[14]. Es gibt unterschiedliche Arten je nachdem welcher NOD-Like Rezeptor beteiligt ist[14]. Wichtig für die Einleitung einer Immunantwort ist das NLRP3-Inflammasom (siehe Abbildung 1: Mechanismus der Induktion einer sterilen Inflammation).



**Abbildung 1: Mechanismus der Induktion einer sterilen Inflammation**

Ein steriler Stimulus aus DAMPs und anderen von nekrotischen Zellen freigesetzten Stoffen führt über die Aktivierung der Immunzelle über u.a. TLR oder NLRP3 zu einer Produktion von inflammatorischen Zytokinen durch Immunzellen. Modifiziert nach Chen et al[1].

Nach Aufnahme von DAMPs in das Phagosom kommt es zu einer Aktivierung von NLRP3 was eine Aktivierung der Caspase 1 zur Folge hat und in einer Freisetzung von IL-1 $\beta$  resultiert. Neben der DAMP Aufnahme der Zelle spielt noch die Hochregulation des NLRP3 mittels Cytokinen und der Signalwege anderer PRRs eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms.

### 2.1.2 Funktion inflammatorischer Mediatoren bei steriler Inflammation mit Fokus auf MIF

Chemokine sind von Zellen sezernierte Moleküle, die chemotaktisch wirken. Der Name Chemokin setzt sich zusammen aus Chemotaxis und Cytokin, also ein chemotaktisch wirkendes Cytokin[15] [16-18] [17].

Mit der Hilfe von Chemokinen entsteht ein komplexes Kommunikationssystem zwischen Zellen, welches für Immunzellen von besonderer Relevanz ist. Durch die Kombinationen aus Chemokinen und Rezeptoren können die Zellen eine Vielzahl von Informationen erhalten[19]. Es kommt durch die Aktivierung des Rezeptors zur einer Signaltransduktion die zu einer Reaktion der Zelle führt, wie z.B. Adhäsion, Chemotaxis oder Sezernierung von weiteren

Chemokinen. Je nach Chemokin werden diese konstitutiv exprimiert oder gespeichert und auf einen bestimmten Stimulus in das Gewebe sezerniert[8, 16].

Die Aufgabe von Chemokinen ist die Initiation, Organisation und Regulierung der Rekrutierung sowie der interstitiellen Migration von Leukozyten zum Infektfokus. Über die Chemokine wird die Position der Leukozyten gesteuert und auch die Pfade, die sie nehmen[20]. Chemokine können nicht nur löslich im Blut oder Gewebe sein, sondern auch immobilisiert an Oberflächen[18]. Somit spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Etablierung einer Immunantwort. Damit ermöglichen sie dem Organismus innerhalb einer sehr kurzen Zeit beschädigtes Gewebe zu lokalisieren, zu beseitigen und zu ersetzen oder die Ausbreitung von pathogenen Erregern stoppen[16, 17]. Die genauen Mechanismen werden in den Kapiteln Rekrutierung von Leukozyten und Migration von Leukozyten erläutert.

Chemokine stellen eine große Gruppen an unterschiedlichen chemotaktisch wirkenden Stoffen dar. Anhand ihrer Cysteinreste erfolgt eine systematische Nomenklatur, die diversen schon lange bekannten Molekülen nun auch einen systematischen Namen gibt. Die einzelnen Stoffe können Abbildung 2 entnommen werden. Die Chemokine lassen sich mittels ihrer Cysteinreste 4 Gruppen unterteilen. Die beiden großen Subgruppen CXC und CC sowie die zwei kleineren C und CX<sub>3</sub>C Gruppen. Die CX<sub>3</sub>C Gruppe besteht nur aus einem einzigen Chemokin, Fraktalkine, welches aber für diese Arbeit von besonderer Bedeutung ist, da dessen Rezeptor (CX<sub>3</sub>CR1) in dieser Arbeit zur Markierung der Monozyten verwendet wird. Für Fraktalkine gibt es eine weitere interessante Besonderheit. Fraktalkine bildet an der Oberfläche der Zelle einen Zell-Adhäsions-Rezeptor, der unter physiologischem Flussverhältnissen einen Arrest von Monozyten ermöglichen kann[21, 22] und ist daher für die Transmigration relevant[19]. Durch das Enzym „TNF- $\alpha$  -Converting“-Enzym kann Fraktalkine von der Zellmembran getrennt werden, so dass es als lösliches Chemokin wirken kann[23, 24].

Genauso wie die Unterteilung in die 4 Gruppen für die Chemokine selbst zutrifft, gibt es auch 4 Gruppen von zugehörigen Rezeptoren. Wobei viele der Rezeptoren unterschiedliche Liganden binden können. Monozyten und neutrophile Granulozyten exprimieren unterschiedliche Rezeptoren und reagieren somit auch auf unterschiedliche Chemokine (siehe Abbildung 2). Nur der Fraktalkine-Rezeptor kann ausschließlich CX<sub>3</sub>CL1 binden[16].

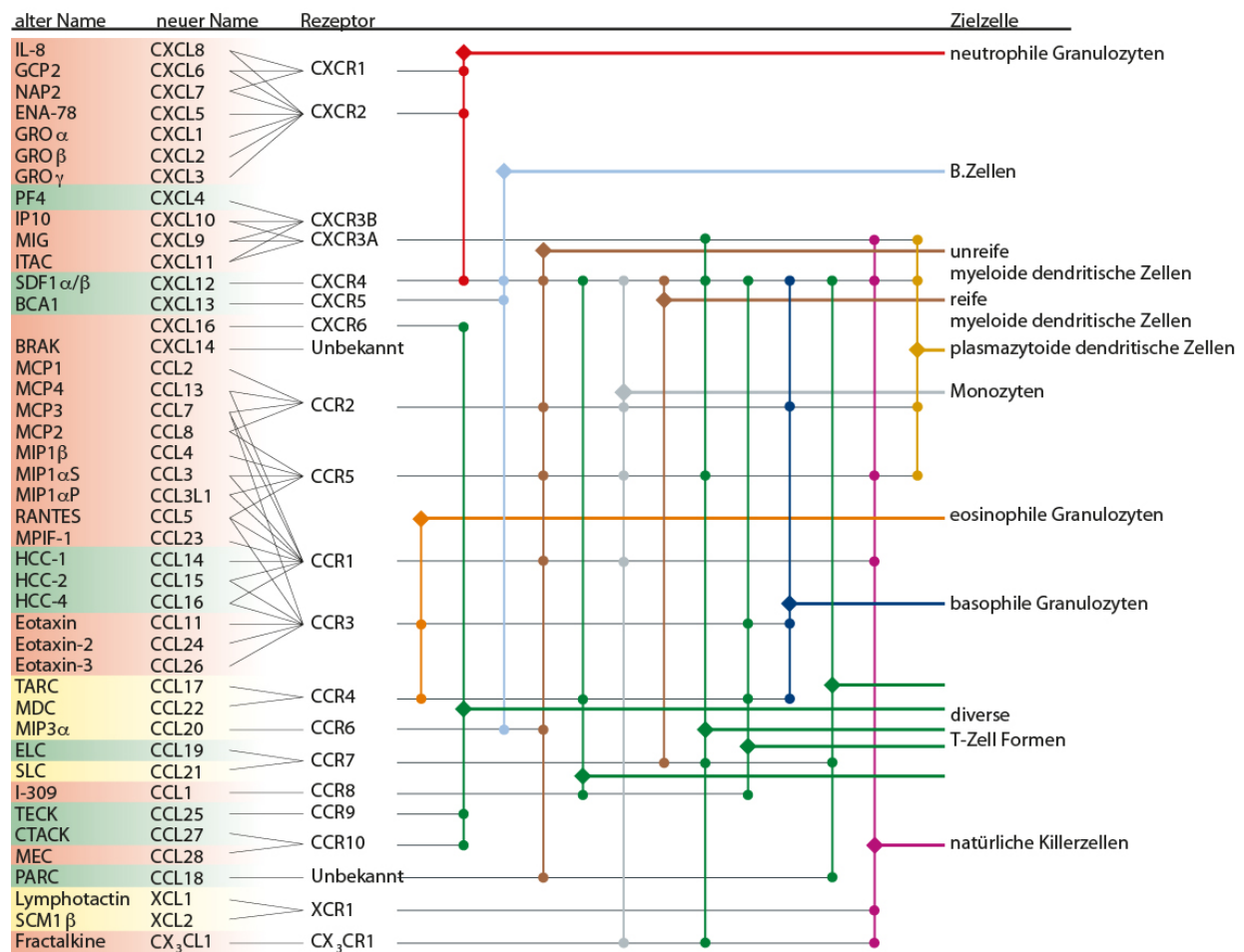


Abbildung 2: Chemokine und ihre Zielzellen

Chemokine und ihre jeweiligen Rezeptoren über die sie auf Zellen wirken. Modifiziert nach Mantovani et al[25].

Chemokine spielen eine entscheidende Rolle für die Migration von Immunzellen. Wichtige proinflammatorische Chemokine sind Interleukin-1 $\alpha$  und  $\beta$ , Interleukin 6 und TNF- $\alpha$  neben einigen anderen. Das Chemokin CXCL8, auch als Interleukin-8 bekannt, sowie Interferon- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  fördern die Rekrutierung, Aktivierung und verlängern das Überleben von neutrophilen Granulozyten[26]. Außerdem kommunizieren neutrophile Granulozyten untereinander u.a. über LTB<sub>4</sub> und werden so für das DAMP fMLP sensibilisiert[27]. Andere Chemokine wie CXCL8 erhöhen die Gradlinigkeit und die Geschwindigkeit der migrierenden Leukozyten[27]. CXCL2, welches über CXCR2 detektiert wird ist in hohen Konzentrationen im Blut in Bereichen einer Leberschädigung zu finden und wirkt so auf zirkulierende Leukozyten[28]. Außerdem führen Chemokine zu einer Aktivierung von Leukozyten und sensibilisieren diese für Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1[29, 30].

Im Folgenden soll vor allem das Chemokin-ähnliche Molekül MIF näher erläutert werden:



Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) ist ein Chemokin-ähnliches Molekül, von welchem angenommen wurde, dass es inhibitorisch auf die Migration von Makrophagen wirkt[31]. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass es über diverse proinflammatorische Eigenschaften verfügt und es ist daher ein essentieller Regulator des angeborenen Immunsystems[32]. Die Relevanz von MIF wird deutlich bei Betrachtungen der vielen wichtigen Krankheitsbildern wie Sepsis, Arteriosklerose und Arthritis bei denen MIF eine große Rolle spielt[33].

Es ist bekannt, dass Monozyten, neutrophile Granulozyten, Makrophagen sowie andere Zellen des Immunsystems im Gegensatz zu den meisten anderen Chemokinen permanent MIF exprimieren und intrazellulär speichern[33]. Der Vorteil der Speicherung und hohen konstitutiven Expression von MIF liegt darin, dass die Expression von MIF zur Hochregulierung des TLR4 Rezeptors führt. Außerdem wurde gezeigt, dass MIF defiziente Mäuse deutlicher Schwächer auf das DAMP LPS reagieren[32, 34]. Somit wird das Immunsystem für pathogene Stoffe sensibilisiert und kann so besser auf Schädigungen des Organismus reagieren.

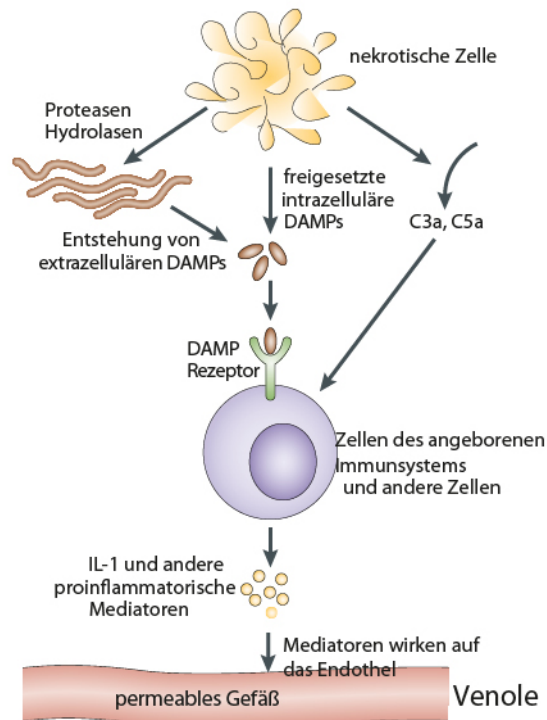
Auf die Stimulation durch pathogene Stoffe reagieren viele Leukozyten mit einer massiven Freisetzung von MIF, was durch die intrazelluläre Speicherung begünstigt wird. Dies ist vor allem wichtig bei gewebsständigen Zellen wie Makrophagen, die mit den Pathogenen als erstes in Kontakt kommen. MIF führt direkt oder indirekt zu einer vermehrten Produktion von Stoffen wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8 und macrophage inflammatory protein 2[35, 36].

MIF ist auch für die Rekrutierung von Immunzellen wichtig. Es bindet an die Chemokinrezeptoren CXCR2 und CXCR4, welche u.a. bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle spielen[37]. Außerdem beeinflusst MIF auch die Migration indem es die Expression von Adhäsionsmolekülen erhöht[38]. So hat Cheng et al gezeigt, dass MIF die Interaktionen zwischen Endothel und Leukozyten erhöht, durch eine Förderung der endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektinen[39].

MIF wird nicht nur von Zellen des Immunsystems exprimiert sondern auch von Zellen und Gewebe, das in direktem Kontakt mit der Umwelt des Wirts steht wie die Lunge, die Haut oder der Gastrointestinaltrakt. Gerade dies unterstreicht die Wichtigkeit von MIF und seine Funktion, da es von Zellen exprimiert wird, die auf Grund ihrer Lage besonders häufig mit pathogenen Stoffen in Kontakt kommen und so durch die Sekretion von MIF das Immunsystem aktivieren können[33].

### 2.1.3 Ablauf der Entzündungskaskade bei steriler Inflammation

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch die PRRs führt dazu, dass gewebständige Zellen wie Makrophagen proinflammatorische Mediatoren wie IL-1 oder TNF- $\alpha$  sezernieren[40].



**Abbildung 3: Aktivierung des Immunsystems über DAMPs und ihre Wirkung auf die Gefäße**

Die durch nekrotische Zellen freigesetzten DAMPs werden von PPRs erkannt, die daraufhin proinflammatorische und vasoaktive Substanzen freisetzen die u.a. auf das Endothel wirken. Modifizierte Darstellung nach Kono et al [2].

Diese Mediatoren wirken auf das Endothel und führen zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, was einen Ausstrom von Plasma zur Folge hat. Weiterhin werden Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche des Endothel exponiert und dadurch neutrophilen Granulozyten und Monozyten zum Ort der Gewebeschädigung rekrutiert[2, 40, 41].

## 2.1.4 Das angeborene Immunsystem bei steriler Inflammation.

### 2.1.4.1 Monozyten

Monozyten sind ein sehr wichtiger Bestandteil des Immunsystems. Sie zirkulieren im Blut und können sich nach der Extravasation in Makrophagen oder dendritische Zellen differenzieren[42]. Monozyten haben außerdem die Fähigkeit proinflammatorische Cytokine zu produzieren, Zellen und toxische Moleküle zu phagozytieren, um so den auslösenden Inflammationsstimulus zu beseitigen. Anschließend und können sie als Antigen-Präsentierende-Zellen dienen, in dem sie das Gewebe verlassen und in die sekundären lymphatischen Organe migrieren[42].

Monozyten lassen sich in 2 Gruppen unterteilen, die sich bei Maus und Mensch sehr ähnlich sind. Unterschieden werden sie durch den Antikörper Gr1. Dieser bindet an das Oberflächenprotein Ly6C[43].

So gibt es die Gr1<sup>-</sup> Monozyten, die den humanen nicht klassischen CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten ähneln. Außerdem exprimieren sie ein hohes Level des Chemokinrezeptors CX<sub>3</sub>CR1, allerdings kein Ly6C und kein CCR2. Daher werden Sie auch CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>CCR2<sup>-</sup> Gr1<sup>-</sup> -Monozyten -Monozyten genannt[44, 45].

Bezeichnend ist außerdem eine CX<sub>3</sub>CR1 abhängige Rekrutierung in das Interstitium und typisch für die CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>CCR2<sup>-</sup> Gr1<sup>-</sup> -Monozyten ist eine längere Lebensdauer sowie das intravaskuläre Patrollieren[42-45].

Die Gr1<sup>+</sup> Monozyten sind vergleichbar mit den humanen klassischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten, die auch inflammatorische Monozyten genannt werden und in entzündetes Gewebe migrieren[46]. Sie exprimieren den Chemokinrezeptor CCR2 und das Oberflächenprotein Ly6C, das von Gr1, einem Antikörper, detektiert wird. Sie exprimieren jedoch nur sehr niedriges Level des Chemokinrezeptors CX<sub>3</sub>CR1[43, 44]. Daher lautet ihre genau Bezeichnung auch CX<sub>3</sub>CR1<sup>lo</sup>CCR2<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>

Sie werden *in vivo* in Lymphknoten und entzündliches Gewebe rekrutiert[43, 44]. Nach dem Monozyten in das Interstitium rekrutiert worden sind differenzieren sie sich zu Makrophagen oder Dendritischen Zellen[47].

#### **2.1.4.2 Neutrophile Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten sind wie Monozyten Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie werden im Knochenmark aus myeloiden Stammzelle gebildet. Sie haben eine kurze Lebensdauer von 7 – 10 Tagen, wobei sie den größten Teil dieser Zeit im Knochenmark verbringen, bevor sie im Blut zirkulieren und bei Inflammation ins Interstitium migrieren[48, 49]. Charakteristisch für die neutrophilen Granulozyten sind ihre Granula. Diese lassen sich in drei Gruppen unterteilen: Primäre Granula (bestehend aus Myeloperoxidasen, Cathepsin G, Neutrophile Elastase und Proteinase 3) deren Aufgabe primär das Zerstören von Mikroorganismen und deren Verdauung ist, sekundäre Granula (u.a. Lactoferrin) und tertiäre Granula, die vor allem aus Gelatinase bestehen[49]. Ihre Granula und die Fähigkeit der Phagozytose tragen zu der Schlüsselrolle der neutrophilen Granulozyten im Immunsystem bei[50]. Andererseits führt die Freisetzung dieser Stoffe häufig zu einer signifikanten Gewebeschädigung, wie z.B. beim Myokardinfarkt, so dass eine Regulierung der Immunantwort essentiell sein kann[51, 52].

#### **2.1.5 Die Phasen der Rekrutierungs von myeloiden Leukozyten zu inflammatorischen Prozessen**

Die darauf folgende Phase der Rekrutierung lässt sich in 4 Schritte unterteilen. Die beiden Subgruppen der Monozyten sowie die neutrophilen Granulozyten unterscheiden sich vor allem hinsichtlich des Zeitpunktes zu dem sie extravasieren. Während  $GR1^-$  Monozyten nach sehr kurzer Zeit aus postkapillären Venolen austreten und neutrophile Granulozyten wenige Minuten später, verlassen  $GR1^+$  Monozyten erst Stunden später die Gefäße und migrieren in das geschädigte Gewebe.

In der ersten Phase reagieren zunächst die in den Blutgefäßen patrollierenden, Monozyten auf die freigesetzten DAMPs und transmigrieren in das geschädigte Gewebe [53].



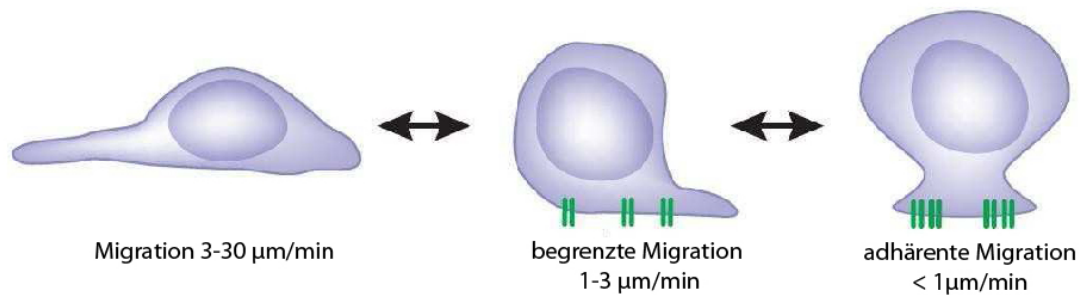
setzen dort ihre Granula frei. Die Granula der neutrophilen Granulozyten enthalten unter anderem CCL3 und CCL4. Die Granulafreisetzung der neutrophilen Granulozyten induziert eine CCL2 Produktion der Endothelzellen, welches über den CCR2 Rezeptor auf die klassischen Monozyten wirkt und eine weitere Rekrutierung induziert[60, 61]. Verstärkt wird die Rekrutierung noch mittels CCL3 und CCL4, welche über den CCR1 Rezeptor auf klassische Monozyten wirken und den Stimulus der Rekrutierung so noch verstärken[62]. Wo nun alle 3 Zelltypen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Monozyten sich an der entzündliche Stellen befinden, beginnt die dritte Phase.

In dieser Phase werden die pathogenen Stoffe (z.B. nekrotische Zellreste oder Bakterien) phagozytiert. Da der pathogene Auslöser nun beseitigt ist, muss der Inflamationsprozess nun reguliert werden. Die apoptotischen neutrophilen Granulozyten setzen unterschiedliche Stoffe frei, die einerseits den Einstrom von weiteren neutrophilen Granulozyten hemmen, gleichzeitig über die Freisetzung von u.a. CX3CL1 noch weitere Monozyten ins Gewebe rekrutieren[63, 64].

In Phase 4 kommt es als Folge der Aufnahme von apoptotischen neutrophilen Granulozyten durch Makrophagen zu einer Freisetzung von Mediatoren wie TGF $\beta$  und IL-10, die antiinflammatorisch wirken[65]. Des Weiteren werden zur Wiederherstellung der Homöostase und zur Reparatur des geschädigten Gewebes Wachstumsfaktoren wie VEGF freigesetzt [66].

### **2.1.6 Physiologie der interstitiellen Leukozytenmigration**

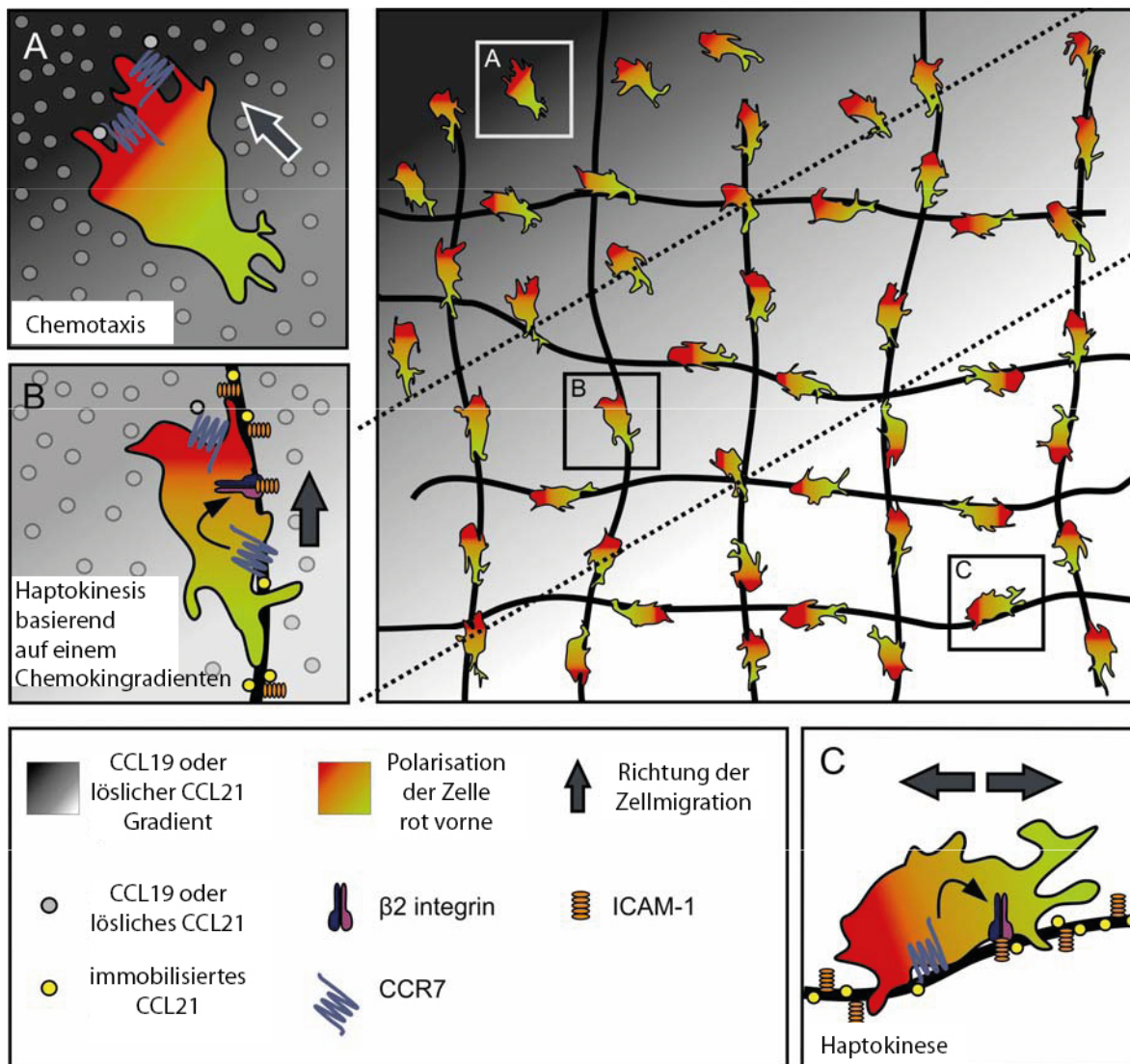
Der Ablauf der Rekrutierung von Immunzellen bis zur Transmigration aus den Gefäßen ist weitgehend bekannt (siehe oben), wie aber Immunzellen im Gewebe außerhalb der Blutgefäße navigieren ist weniger gut charakterisiert und soll im Folgenden erläutert werden[67]. Essentiell für die Eradikation von pathogenen Erregern oder die Beseitigung von nekrotischen Zellen ist, dass Leukozyten zur rechten Zeit am richtigen Ort im Gewebe befinden. Sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem sind für ihre Aufgaben auf die interstitielle Migration und die damit verbundenen Mechanismen angewiesen, um sich im Gewebe zu orientieren und den Entzündungsfokus zu erreichen[68, 69]. Therapeutisch könnte die interstitielle Migration ein Ansatzpunkt bieten um ungewünschte Entzündungsprozesse, wie beim pathologischen Gewebeumbau der zur Fibrosierung führt zu supprimieren[70].



**Abbildung 5: Migrationsarten von Leukozyten**

Migrationsformen und die korrespondierenden Bereich der Geschwindigkeit. Modifiziert nach Friedl et al [71].

Bei der interstitiellen Migration lassen sich grundsätzlich drei Bewegungsmuster unterscheiden, die abhängig sind von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen: die schnelle amöboide Migration 5-25  $\mu\text{m}$ , die langsame durch Chemokine lokal begrenzte Bewegung 2-5  $\mu\text{m}$  und die adhäsive Migration. Während der Migration im Gewebe wechseln die Zellen immer wieder zwischen diesen drei Bewegungsmustern, wobei es auch Zwischenstufen gibt. Die amöboide Migration basiert auf Veränderung der Zellform und findet ohne Kontakt zu einer Oberfläche über Integrine statt[67]. Der adhäsive Arrest ist eine Zell-Zellinteraktion und wird etwa über  $\beta 2$ -Integrine wie ICAM-1 vermittelt[72]. Eine Zwischenstufe zwischen der amöboiden Migration und dem Integrin vermittelten Arrest, stellt die lokal begrenzte Migration dar[67].



**Abbildung 6: Immobilisierte Chemokine und lösliche Chemokine und ihr Einfluss auf interstitielle Migration**

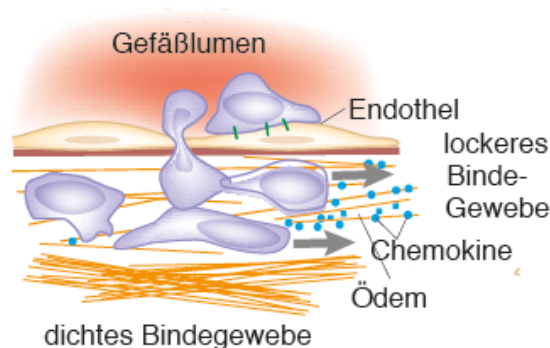
Das Netz stellt das fibroretikuläre Zellnetzwerk in sekundären lymphoiden Organen dar. Auf dem Netzwerk befinden sich immobilisiertes CCL21 sowie das Integrin ICAM-1. Außerdem sind die verschiedenen Migrationsmöglichkeiten in einer solchen Umgebung dargestellt. A) Chemotaxis; B) Haptokinese entlang eines löslichen chemokingradienten und immobilisierter Chemokine; C) Haptokinese die auf das Netzwerk beschränkt ist. Modifiziert nach Schumann et al [20].

Die Migration von Leukozyten unterscheidet sich nicht nur hinsichtlich der Geschwindigkeit, sondern ist auch abhängig vom Gewebe sowie der Präsentation der jeweiligen Chemokine[67]. Haptokinese ist eine adhäsionsabhängige Migration entlang zweidimensionaler Strukturen, wie z.B. entlang der Basalmembran, jedoch ohne klare Richtung. Vermittelt wird diese Interaktion über z.B. ICAM-1 und dem von Leukozyten exprimierten Integrin LFA-1. Ist die Richtung der Haptokinese von Chemokingradienten abhängig, spricht man in diesem Fall von Haptotaxis[73]. Chemotaxis ist eine gerichtete



Migration entlang eines Chemokingradienten im Gewebe. Leukozyten verfügen über bestimmte Rezeptoren für Chemokine. Bindet ein Chemokin an einen Rezeptor polarisiert der Leukozyt und bildet Pseudopodien aus, was im Endeffekt zu amöboider Migration führt. Durch wiederholtes Ausbilden von Pseudopodien migriert die Zelle entlang der zunehmenden Chemokinkonzentration[74]. Der Unterschied zwischen Chemotaxis und Haptotaxis ist, dass bei Chemotaxis die Chemokine freilöslich sind. Im Gegensatz dazu sind bei Haptotaxis die Chemokine auf Zellen oder der extrazellulären Matrix immobilisiert[73].

Leukozyten machen sich gewisse Beschaffenheiten des extravasalen Raums zunutze, um an gewissen Leistrukturen, wie z.B. Zellobeflächen entlang zu migrieren. Während der Migration kommt es dabei immer zu Interaktionen zwischen den Leukozyten und der Leitstruktur. Für die T und B-Lymphozyten ist dies im Lymphknoten beschrieben, wo sie präferiert entlang der fibroretikulären Zellen und dendritischer Zellen migrieren[75, 76]. Die Zellen bieten den Leukozyten ein strukturelles Gerüst, außerdem exprimieren sie ICAM-1 und Chemokine an ihrer Oberfläche[75]. Weiterhin wurde gezeigt, dass oberflächlich immobilisierte und präsentierte Chemokine wie CCL21 im Lymphknoten durch Integrin vermittelte Adhäsion die Migration von dendritischen Zellen durch einen haptokinetischen Stimulus auf ein Areal begrenzen können[20].



**Abbildung 7: Theorie des perivaskulären Raums**

Ein perivaskulärer Raum entsteht durch ein Ödem, in dem möglicherweise Leukozyten bevorzugt migrieren. Modifiziert nach Friedl et al. [71].

Von Friedl wurde 2000 die Hypothese aufgestellt, dass Leukozyten zum Teil den perivaskulären Raum zur Migration nutzen. Im Rahmen der Diapedese des vaskulären Lecks und des hydrostatischen Drucks entsteht ein perivaskulärer Raum in dem die Leukozyten bevorzugt in das entzündete Gewebe migrieren können[71]. Dies konnte jedoch nicht bisher *in vivo* nachgewiesen werden.

## 2.2 Die Bedeutung von Perizyten bei Entzündungsprozessen

Perizyten sind mesenchymale Zellen der Mikrozirkulation, die das Endothel mit ihren Fortsetzten umhüllen und so ein diskontinuierliches Netz um das Endothel bilden[54]. Perizyten befinden sich zwischen dem Endothel und dem Interstitium und sind in die vaskuläre Basalmembran eingebettet[77, 78]. Sie unterscheiden sich relativ stark in ihrer Funktion je nach ihrer Organlokalisation. Perizyten sind sie bis zu 200µm lang und ungefähr 20 µm breit und können sich mit ihren langen Fortsätzen auf mehr als einer Kapillare ausbreiten[79].

Die Herkunft der Perizyten ist noch nicht ausreichend beschrieben. Als Vorläuferzellen scheinen interstitielle Fibroblasten sowie mesenchymale Stammzellen zu dienen[80, 81]. Es wird vermutet, dass sich Perizyten noch zu anderen mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten, Chondrozyten und Phagozyten differenzieren können[82].

Unterschiedliche Marker können zur Identifikation von Perizyten und ihren Subpopulationen herangezogen werden. Je nach Lokalisation exprimieren Perizyten unterschiedliche Marker. Desmin und  $\alpha$ -SMA fungieren als intrazelluläre Marker zur Identifikation von Perizyten[83, 84]. Da  $\alpha$ -SMA sowohl von Perizyten als auch glatten Muskelzellen exprimiert wird, lassen sich glatte Muskelzellen durch die Expressierung von Calponin abgrenzen.

Ein weiterer Marker ist das Proteoglycan Neuron-Glial Antigen 2 (NG2). Es gibt unterschiedliche Populationen von Perizyten in der Mikrozirkulation die mittels NG2 Expression unterschieden werden können. Perizyten, die an postkapillären Venolen lokalisiert sind, sind NG2-  $\alpha$ -SMA+. Hingegen exprimieren Perizyten an arteriolen und Kapillaren sowohl NG2 als auch  $\alpha$ -SMA+[85].

Die Funktion der Perizyten ist bisher weitestgehend unerforscht. Im zentralen Nervensystem stellen sie einen essentiellen Teil der Blut-Hirn-Schranke dar[77, 86]. Außerdem ist bekannt, dass Perizyten über parakrine Signalwege mit Endothelzellen kommunizieren[79]. Auf Grund ihrer günstigen Lokalisation zwischen dem Blutfluss und dem Interstitium lässt sich vermuten, dass sie eine Rolle bei Entzündungsprozessen spielen, was jedoch bisher

unzureichend erforscht ist. Es wurde gezeigt, dass Perizyten als Reaktion auf inflammatorische Cytokine wie Interferon- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  das Adhäsionsmolekül ICAM-1 sowie MHC1 exprimieren und hochregulieren[87]. Des Weiteren ist bekannt, dass Perizyten mit dem erworbenen Immunsystem *in vitro* interagieren und an der Modulation von T-Zellen bei inflammatorischen Prozessen beteiligt sind [87, 88]. Der Einfluss von Perizyten auf das angeborene Immunsystem ist jedoch fast vollständig unbekannt. Es wurde lediglich gezeigt, dass die Überwindung der Basalmembran durch neutrophile Granulozyten in postkapillären Venolen von NG2- Perizyten reguliert wird [89]. Welche Rolle NG2<sup>+</sup> Perizyten, die bei Arteriolen und Kapillaren lokalisiert sind, spielen ist weites gehend unbekannt.

### 3 Zielsetzung

Eine sterile Inflammation ist eine essentielle Immunreaktion an der viele unterschiedliche Chemokine, Mediatoren und Zelltypen beteiligt sind. Im Vordergrund der bisherigen Forschungen standen vor allem intravaskuläre Prozesse primär die Interaktionen zwischen Immun und Endothelzellen. Während im Lymphknoten eine viel Zahl von Interaktionen zwischen Immunzellen und fibroretikulären Zellen, sowie anatomischen Strukturen beschrieben worden sind, sind derartige Prozesse bei der sterilen Inflammation und der interstitiellen Migration *in vivo* unzureichend untersucht worden. Ob Perizyten durch ihre günstige strategische Lage *in vivo* auf sterile Inflammationen reagieren und die interstitielle Migration von myeloiden Leukozyten haben ist unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob und wie Perizyten vor allem *in vivo* auf eine sterile Inflammation reagieren. Außerdem soll untersucht werden, ob Perizyten einen Einfluss auf die interstitielle Migration haben. Hierzu wird ein Mausmodell für eine diffuse sowie eine fokale sterile Inflammation verwendet mit dessen Hilfe folgende Punkte untersucht werden sollen.

#### **Untersuchung der Interaktionen zwischen myeloiden Leukozyten und Perizyten bei steriler Inflammation**

Damit es möglich ist Interaktionen zwischen Perizyten und myeloiden Leukozyten *in vivo* zu untersuchen wird das sogenannte Ohr-Modell verwendet. Ein Mausmodell, das es ermöglicht mit Hilfe von 2-Photonen-Mikroskopie die Mikrozirkulation und die oben genannten Zellen *in vivo* im Ohr darzustellen. Für dieses Mausmodell werden LysM-eGFP-NG2DsRed oder CX<sub>3</sub>CR1-eGFP-NG2Dsred Chimären verwendet. Außerdem ermöglicht dieses Modell mittels s.c. Injektion von TNF- $\alpha$  respektive fMLP oder einer Laser induzierten Nekrose eine sterile Inflammation zu erzeugen. Auch wird ein Antikörper verwendet, um zu zeigen, ob dies mögliche Interaktionen beeinflusst.

#### **Die chemotaktische Wirkung von Perizyten auf myeloide Leukozyten bei steriler Inflammation**

Um zu untersuchen, ob Perizyten chemotaktisch auf myeloide Leukozyten *in vivo* wirken, werden die Migrationsgeschwindigkeit sowie die Migrationspfade einzelner myeloider Leukozyten untersucht. Außerdem werden mögliche Kontakte zu Perizyten hinsichtlich möglicher chemotaktischer Stimuli untersucht. Des weiteren werden die Lokalisationen der myeloiden Leukozyten im Interstitium mittels verschiedener Analyseverfahren quantifiziert.

Auch wird *in vitro* untersucht ob Perizyten bei steriler Inflammation den chemotaktischen Stoff MIF bilden, speichern und exprimieren.

### **Die Aktivierung von myeloiden Leukozyten durch Perizyten bei steriler Inflammation**

Des weiteren soll geklärt werden, ob Perizyten myeloide Leukozyten *in vivo* aktivieren und beeinflussen. Außerdem soll die Rolle des chemotaktischen Moleküls MIF in diesem Zusammenhang untersucht werden. Dazu werden verschiedene Migrationsparameter verglichen und analysiert ob diese sich unterscheiden zwischen interagierenden und nicht interagierenden myeloiden Leukozyten. Auch wird untersucht, ob die Lokalisation der myeloiden Leukozyten zu den Perizyten einen Einfluss auf das Migrationsverhalten und seine Parameter hat. Weiterhin wird untersucht, ob eine Inhibierung des chemotaktischen Stoffes MIF diese Prozesse beeinflusst, um so die Rolle von MIF bei der interstitiellen Migration genauer zu untersuchen.

### **Der Einfluss der Interaktionen zwischen Perizyten und myeloiden Leukozyten bei steriler Inflammation auf die interstitielle Migration.**

Anschließend soll *in vivo* geklärt werden, ob und welchen Einfluss die Interaktion zwischen myeloiden Leukozyten und Perizyten auf das Erreichen eines sterilen Inflammationsfokus hat. Außerdem soll untersucht werden, ob MIF von Relevanz ist, für das schnelle und effektive Erreichen einer fokalen sterilen Inflammation. Hier zu sollen die Migrationsparameter von nicht interagierenden und interagierenden myeloiden Leukozyten verglichen werden. Analysiert soll ebenfalls werden, ob eine Gruppe schneller die fokale sterile Inflammation erreicht.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Die Maus als Versuchstier**

#### **4.1.1 Haltung und Zucht**

Für die Maus als Versuchstier spricht ihre schnelle Generationszeit, die problemlose Aufzucht und ihre kostengünstige Haltung. Auch erweist sie sich auf Grund ihrer Größe als besonders geeignet für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen und wurde sowohl für die in vivo Versuche als auch histologischen Untersuchungen verwendet.

Die in den Experimenten verwendeten Tiere stammen überwiegend aus Eigenzucht oder wurden bei Charles River (Sulzfeld) erworben. Die Zucht der Mäuse erfolgt durch polygame Verpaarung nach dem Harem-System, wonach drei bis fünf Weibchen mit einem Männchen in einem Käfig gehalten werden. Gehalten werden die Mäuse in der räumlich abgetrennten Tierhaltung in Gruppen von bis zu sechs Tieren in Makrolonkäfigen des Typs III mit erhöhter Ausfertigung (Tecniplast, Hohenpeißenberg). Gemäß der Mindestanforderung für ausgewachsenen Tiere über 20g verfügen sie über eine Grundfläche von 100 cm<sup>2</sup> je Tier.

Die Käfige sind individuell ventiliert (IVC) und werden mit HEPA-gefilterter Raumluft versorgt. Der Luftwechsel erfolgt 50 bis 70 mal pro Stunde, woraus eine sehr gute hygienische Abschirmung der Tiere resultiert. Die Mäuse werden zudem auf einem entkeimten und entstaubten Weichholzgranulat (LIGNOCEL r BK 8-15, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg) gehalten, bei wöchentlichem Wechsel der Einstreu. Der Raum wird zwischen 20 und 25 Grad Celsius temperiert und die Raumfeuchtigkeit liegt zwischen 45 – 65%. Die Lichtintensität beträgt 50 bis 100 Lux, wobei ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden eingehalten wird.

Was die Versorgung der Mäuse betrifft, so steht ihnen Wasser und Futter (#1320 Ratte/Maus Haltungsdiät, Altromin, Lage) ad libitum zur Verfügung. Im Rahmen der Chimären Generierung, bzw. nach Radiatio bekommen die Tiere saures Wasser (pH 3,1) mit Antibiotikum Cotrimoxazol (Ratiopharm, Ulm) über einen Zeitraum von zwei Wochen zur Infektionsprophylaxe.

Das vorliegende Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung Oberbayern gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG. in der Fassung vom 25.05.1998) genehmigt

### 4.1.2 Tierstämme

Bei den Versuchen wurden folgende Stämme verwendet:

- NG2DsRed
- LysMeGFP
- CX<sub>3</sub>CR1eGFP

Um das Migrationsverhalten von Monozyten/Makrophagen (CX<sub>3</sub>CR1eGFP) und neutrophilen (LysMeGFP) Granulozyten bei induzierter steriler Inflammation in Abhängigkeit von Perizyten in vivo zu visualisieren, benötigt man Knochenmark-Chimären. Dies werden durch Injektion von isolierten Knochenmarkszellen aus LysMeGFP oder CX<sub>3</sub>CR1eGFP Mäusen in bestrahlte NG2DsRed Mäuse erstellt, bei den NG2<sup>+</sup> Perizyten das rot fluoreszierende Transgen DsRed exprimieren. Somit sind in den Chimären im 2-Photonen Mikroskop die Perizyten in rot sichtbar, während Monozyten/Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten eine grüne Fluoreszenz aufweisen[90, 91].

### 4.1.3 NG2DsRed

Initial wurden die NG2DsRed-Mäuse bei Charles River Laboratories (Sulzfeld) erworben und zur Vermehrung des Bestandes im Tierstall weiter verpaart. Die Generierung der NG2DsRed Mäuse erfolgte mittels der Bac Modifizierungstechnik nach Heintz[92].

In den NG2DsRed transgenen Mäusen wird somit das rot fluoreszierende Protein DsRed unter der Kontrolle des NG2 Promotors exprimiert. positiven Zellen DsRed im gesamten ZNS sowie in der Peripherie. Somit können auch im Ohr NG2<sup>+</sup> Zellen visualisiert werden[91].

### 4.1.4 LysM-eGFP

Durch die Markierung mit Hilfe des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) konnte ein Verfahren entwickelt werden, das die Markierung von myelomonozytären Zellen ermöglicht. Dies gelingt mit Hilfe eines Knock-in des enhanced GFP (eGFP) in den Lysozym M (LysM) Locus. Lysozym M wird zum Teil auch von Monozyten exprimiert, allerdings ist dieser vernachlässigbar gering. Andere myelomonozytären Zellen weisen keine Fluoreszenz auf. Da reife neutrophile Granulozyten am stärksten fluoreszieren, eignet sich LysM-eGFP sehr gut

zur Markierung und Darstellung von neutrophilen Granulozyten in vivo[90].

#### **4.1.5 CX<sub>3</sub>CR1**

Der CX<sub>3</sub>CR1 Rezeptor ist ein Sieben-Transmembranrezeptor für das Chemokin Fractalkine. Um die physiologische Funktion des CX<sub>3</sub>CR1 Rezeptors zu untersuchen, wurde eine Mauslinie geschaffen, bei der das CX<sub>3</sub>CR1 Gen durch ein GFP Reporter-Gen ersetzt wurde. Da v.a. Monozyten/Macrophagen CX<sub>3</sub>CR1 exprimieren, kann so ihr Migrationsverhalten in vivo visualisiert werden[90]. In der vorliegenden Arbeit wurden heterozygote Tiere für die Versuche verwendet.

#### **4.1.6 Erstellen von Knochenmarkchimären**

Um Perizyten sowie Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten in vivo mit einem 2-Photonen Mikroskop darzustellen[90], wird eine Knochenmark-Chimäre benötigt, also ein Organismus, der aus zwei unterschiedlichen genetischen Zellen besteht.

Für die Erstellung von Chimären benötigt man einen Knochenmarkspendertier, dessen Zellen in vier Empfängertier i.v. injiziert werden. Dabei dienen die NG2DsRed Mäuse als Empfänger, die LysM-eGFP und CX<sub>3</sub>CR1-eGFP Mäuse als Spender. Das Empfängertier, in diesem Fall die NG2DsRed-Maus, wird bestrahlt und ihr daraufhin das vom Spendertier entnommene isolierte Knochenmark über die Schwanzvene injiziert. Acht Wochen nach der Injektion können die Chimären für die Experimente verwendet werden.

#### **4.1.7 Bestrahlung**

Die Knochenmarkstransplantation setzt eine vollständige Eradikation des eigenen Knochenmarks voraus. Um dies zu erreichen, werden die Tiere zweimal bestrahlt. Dazu werden ein bis zwei Mäuse in ein steriles Becherglas gesetzt und dieses wird mit autoklavierten Filterpapier (Tecniplast, Hohenpeißenberg) verschlossen. Die Gläser werden zum Transport zur Bestrahlungseinheit (Bestrahlungsanlage OB29-BA, Buchler, Braunschweig) in einem Transportkäfig (Tecniplast, Hohenpeißenberg) untergebracht. Vor



Ort wird das Glas mit den Mäusen in der Vorrichtung der Caesium-Bestrahlungsquelle platziert und anschließend mit 6,5 Gray bestrahlt. Dies wird am darauf folgenden Tag wiederholt und anschließend das Knochenmark des Spendertiers injiziert.

#### 4.1.8 Präparation des Knochenmarks

Die für das Knochenmark notwendige Pufferlösung, bestehend aus PBS+5% FCS (Fetale Calf Serum, Invitrogen, Carlsbad, USA) + 2mmol EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim), wird hergestellt und erhitzt. Die LysM-eGFP bzw. CX<sub>3</sub>CR1-eGFP Maus wird mittels Isolfuran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH) narkotisiert und durch Dislokation der Halswirbelsäule euthanasiert. Die Haut der Maus wird mit 70%igem Ethanol (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn) desinfiziert und die Haut an den Füßen inzidiert und abpräpariert. Beine und Arme werden im Gelenk abgesetzt und anschließend wird vom Knochen die Muskelatur abgetragen. Den gereinigten Knochen legt man anschließend in eine mit 10ml der hergestellten Pufferlösung gefüllten Zellkulturschale (Cellstar Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen).

Die Präparation der Knochenmarkszellen erfolgt an der Sterilbank (Typ HS12, Heraeus, Hanau). Dafür wird ein Sieb (Cell Strainer, 40µm Nylon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) mit 40µm Maschenabstand auf ein 50ml Falcontube (50ml Polypropylen Conical Tube, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) aufgelegt. Mittels Skalpell werden die Epihyphen in einer Zellkulturschale abgetrennt und das Knochenmark aus dem Knochen mit dem hergestellten Puffer in das Sieb gespült. Für den Spülvorgang wird eine Spritze (B. Braun, Melsungen) und eine Kanüle (26G, BDMicrolance, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) benötigt. Das Falconröhrchen wird mit 30ml Puffer aufgefüllt und anschließend mit 1800 rpm bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der nun entstandene Überstand wird abgesaugt und das Sediment in 2,5 ml 8% Ammoniumchlorid-Lösung (1,5 M NH<sub>4</sub>Cl + 0,1 M KHCO<sub>3</sub> + 10mM EDTA, alle Sigma-Aldrich, Steinheim) resuspendiert und - um die Erythrozyten zu lysieren - 4 Minuten bei 4°C inkubiert. Erneut wird auf 30ml mit Puffer aufgefüllt und bei 1800 rpm bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wird das verbleibende Sediment in 2ml RPMI-Medium (Biochrom AG, Berlin) resuspendiert. Zum darauf folgenden Auszählen der Zellen wird eine Neubauer-Zählkammer verwendet.

Bis die Injektion der Zellsuspension bei den bestrahlten Mäusen möglich ist, wird diese auf Eis gelagert. Die Zellen müssen vor der Transplantation erneut bei 1800 rpm und 4 Grad zentrifugiert und mit 2-4 ml PBS resuspendiert werden. Pro Maus werden 5 Millionen Zellen in 300 µl PBS über die Schwanzvene mit einem Katheter (Katheterschlauch Portex, Polyethene Tubing, 0,28mm ID, Smiths Medical, USA) injiziert.

#### **4.1.9 Schwanzveneninjektion**

Die Knochenmarkszellen lassen sich sehr gut intravenös über die Schwanzvene injizieren, da diese ein ausreichendes Kaliber aufweist und günstig lokalisiert ist. Dies gilt vor allem für die beiden lateralen Venen. Das Empfängertier wird in einer Fixations-Vorrichtung (Injektionskäfig, Typ Broome HAR-52-04xx, Föhr Medical Instruments GmbH) fixiert. Die Vene wird gestaut, in dem der Schwanz zwischen Zeige- und Mittelfinger komprimiert wird. Eine zusätzliche Weitung des Gefäßes erreicht man durch Auflage eines mit warmem Wasser gefüllten Handschuhs. Vor der Punktion wird die gewählte Stelle mit Octanipet desinfiziert. Mit einem Katheter mit einer aufgesetzten Kanüle (30G) wird die Vene punktiert und Knochenmarksuspension kann appliziert werden. 8 Wochen nach Injektion können die Chimären für die Versuche verwendet werden.

### **4.2 Die 2-Photonen Mikroskopie**

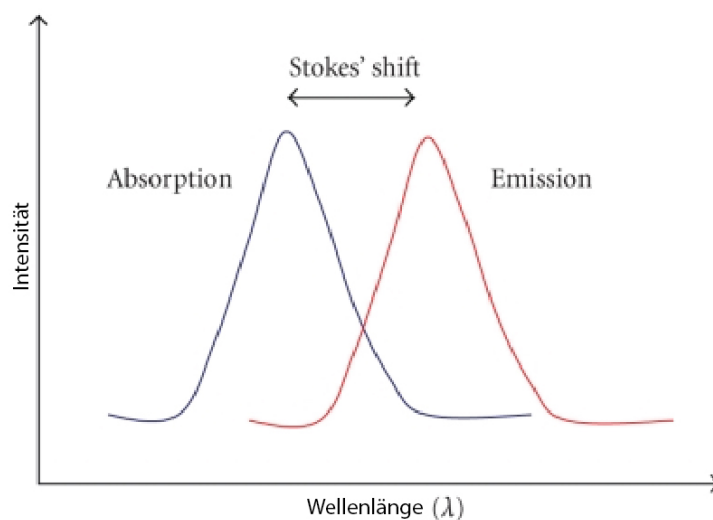
Die Anregung von Fluoreszenzmolekülen mittels eines Zwei-Photonen-Mikroskop entsteht durch zwei physikalische Phänomene. durch die nahezu gleichzeitige Absorption zweier langewilliger Photonen durch ein Fluoreszenzmolekül und die Streuung des Laserstrahls an bestimmten Molekülen[93, 94]. Wie dies genau funktioniert und wie ein Zwei-Photonen-Mikroskop aufgebaut ist, wird in den folgenden Abschnitten erläutert.

#### **4.2.1 Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie**

Das Phänomen der Fluoreszenz resultiert aus der Absorption ankommender Photonen durch ein Fluoreszenzmolekül, das hierdurch angeregt wird und daraufhin eine Fluoreszenzsignal emittiert. Dies ist dadurch zu erklären, dass mittels der Energie des ankommenden Photons

ein Elektron des Farbstoffes auf ein höheres Energieniveau gehoben wird. Das durch das Photon angeregte Elektron verbleibt für wenige Nanosekunden auf dem höheren Energieniveau und fällt anschließend auf das ursprüngliche Energieniveau zurück. Während des Zurückfallens auf das ursprüngliche Energieniveau wird ein Großteil der vorher gespeicherten Energie emittiert. Dieses emittierte Licht ist langweiliger als das zur Anregung verwendete und damit energieärmer. Diese Differenz bezeichnet man als Stokes-Shift oder Stokes'sche Regel und beschreibt die Differenz der Wellenlänge zwischen absorbiertem und emittiertem Licht[95]. Auf Grund der unterschiedlichen Wellenlänge, hat das emittierte Licht auch eine andere Farbe[95]. Regt man beispielsweise mit blauem Licht an, entsteht in der Regel grüne Fluoreszenz.

Im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie wird dieser Effekt durch ein einzelnes Photon erzeugt. Das Photon hat in der Regel eine kurze Wellenlänge und ist damit energiereicher.



**Abbildung 8: Stokes Shift**

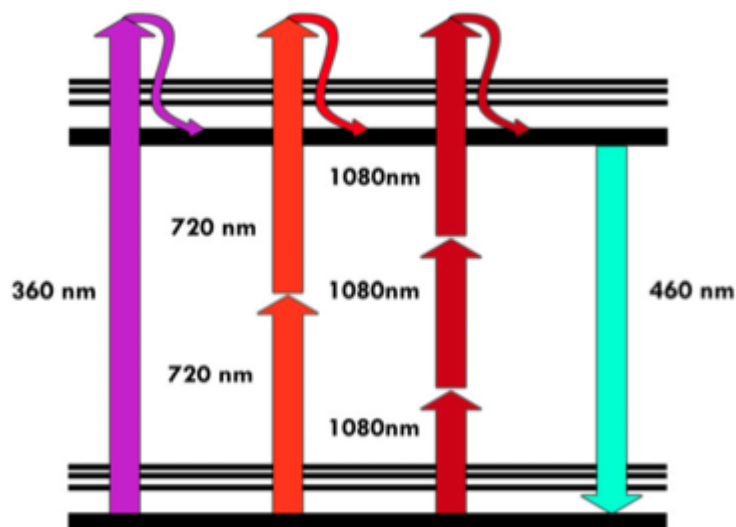
Intensität und Wellenlänge der Absorption und Emission. Stokes Shift resultiert aus der Differenz.

#### 4.2.2 Multiphotonen- und lineare Fluoreszenzmikroskopie

Die meisten Multiphotonen-Mikroskope sind Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskope und ein solches wurde auch bei den dieser Arbeit zu Grunde liegenden Versuchen verwendet. Bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie, wie schon oben beschrieben, versetzt ein hochenergetisches Photon ein Elektron eines fluoreszierenden Moleküls in ein höheres Energieniveau. Beim Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskop wird dieser Effekt durch das

gleichzeitige Absorbieren von zwei Photonen erzeugt. Die Anregung durch drei oder mehr simultan eintreffender Photonen ist ebenfalls möglich.

Beim normalen Fluoreszenzmikroskop hat das anregende Photon eine kürzere Wellenlänge, ist also energiereicher als das daraufhin emittierte Photon. Beim Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskop haben die anregenden Photonen eine größere Wellenlänge und sind damit energieärmer. Zwar sind auf Grund der längeren Wellenlänge die Photonen einzeln betrachtet energieärmer, da sie aber beim Zwei-Photonenmikroskop simultan eintreffen, addiert sich die Energie der beiden Photonen und somit wird mindestens dieselbe Energie erreicht, wie beim herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop. Man ersetzt somit ein hochenergetisches und somit schädlicheres Photon durch zwei mit niedrigerer Energie[95-97].



**Abbildung 9: Jablonski Schema**

Fluoreszenzanregung eines bei 360 nm Wellenlänge leuchtenden Farbstoffes und die jeweiligen Energieniveaus. Ein (lila), zwei (hellrot) oder drei Photonen werden absorbiert um ein Fluoreszenz-Photon mit einer Wellenlänge von 460 nm zu emittieren. Modifiziert nach Diaspro et al [95].

#### 4.2.3 Aufbau eines Zwei-Photonen-Mikroskops

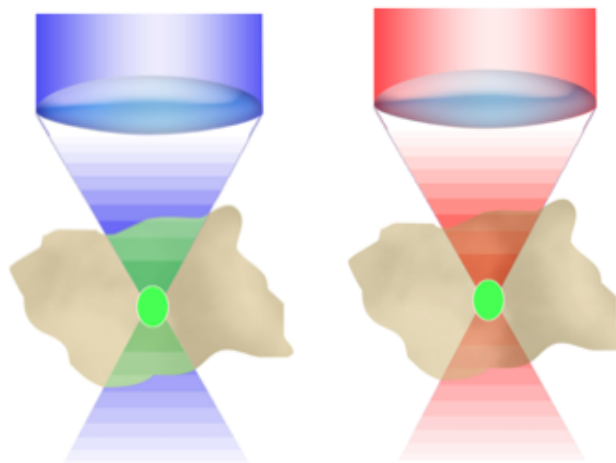
Das simultane Eintreffen von zwei Photonen setzt eine sehr hohe Photonendichte voraus. Um diese zu erreichen, benötigt man einen gepulsten Laser. Es werden normalerweise extrem schnelle Titanium-Saphir-Laser verwendet, die mit einer Frequenz von bis 100 MHz arbeiten. Dieser Laser ist also in der Lage, sehr kurze, hoch energetische Laserpulse auszusenden und

dies bis zu 100 Millionen mal pro Sekunde. Der Laser lässt sich mit einer Wellenlänge von 700 bis 1080nm betreiben[98].

Der erzeugte Laserstrahl wird mit Hilfe eines Scanspiegels in seiner Position verändert, so dass er Fokuspunkt für Fokuspunkt das Präparat abfährt. Die dabei entstehende Fluoreszenz wird über das Objektiv aufgefangen und mittels dichroitischer Strahlenteiler spektral getrennt und zum Detektor weitergeleitet[97]. Durch das Abfahren des Präparates wird immer nur die Fluoreszenz eines Punktes bestimmt. Das gesamte Bild wird aus diesen Punkten erst am Computer zusammengesetzt[95].

#### 4.2.4 Vorteile der Zwei-Photonen Mikroskopie im Vergleich zur herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie

Beim Zwei-Photonen Mikroskop erzeugt, wie bereits beschrieben, ein gepulster Laser die Photonen, da nur dieser im Stande ist, im Fokuspunkt die notwendige Photonendichte zu erzeugen, sodass zwei Photonen gleichzeitig auf ein Fluoreszenzmolekül treffen können. Da diese Dichte auf den Fokus beschränkt ist, wird auch nur dort Fluoreszenz erzeugt. Im Gegensatz zum herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop, wo durch die hochenergetischen Photonen auch umliegendes Gewebe angeregt wird[95].



**Abbildung 10: Vergleich von Fluoreszenz Mikroskopen**

Links ein normales Fluoreszenz Mikroskop. Das Blaue Licht erzeugt nicht nur grüne Fluoreszenz im Fokus (grüner Kreis) sondern auch im umgebenden Gewebe (Braun) und somit dort auch Phototoxizität. Rechts ein Multiphotonen Mikroskop, bei dem die Anregung und damit auch die Phototoxizität nur auf den Fokus beschränkt ist. Darstellung modifiziert nach Diaspro et al [95].

Ein weiterer Vorteil ist, dass die Phototoxizität auf einen extrem kleinen Bereich beschränkt bleibt, was auch auf die selektive Anregung der Fokusebene zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu ist bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie das gesamte umgebende Gewebe betroffen[95]. Außerdem hat langwelliges Licht eine höhere Eindringtiefe als kurzwelligeres, da es im Gewebe weniger gestreut wirkt. Daraus ergibt sich für die Zwei-Photonenmikroskopie der Vorteil, dass wesentlich tieferes Gewebeschnitten untersucht werden können. Im Vergleich zu einem Fluoreszenzmikroskop[98].

#### **4.2.5 Second Harmonic Generation**

Der Second Harmonic Generation liegt folgendes Phänomen zu Grunde: Bei der Bestrahlung durch einen Laser mit hoher Intensität entsteht an bestimmten Molekülen Strahlung mit doppelter Frequenz. Die Lichtgeschwindigkeit, die eine Konstante darstellt, ist das Ergebnis der Multiplikation von Frequenz und Wellenlänge. Somit entspricht die Verdopplung der Frequenz einer Halbierung der Wellenlänge, die sogenannte Second Harmonic Generation (SHG). Die Entstehung einer SHG setzt allerdings voraus, dass die elektrischen Eigenschaften des bestrahlten Stoffes sich in allen Dimension unterscheiden, das heißt, dass es asymmetrisch ist[93, 99]. Das SHG entsteht wie die Fluoreszenz ebenfalls nur im Fokus eines gepulsten Lasers. Die technischen Voraussetzungen für Zwei-Photonen Fluoreszenz und SHG sind im Prinzip dieselben, so dass ein Gerät, welches für Zwei-Photonen Fluoreszenz konzipiert worden ist meistens auch ein SHG erzeugen kann.[93, 99] Auf Grund der physikalischen Eigenschaften der SHG wird ein besonders starkes Signal an periodischen Strukturen wie z. B. Myosin oder Kollagenfasern erzeugt. Somit erleichtert es die Orientierung im Gewebe[93, 99]. Dies spielt vor allem in dem hier beschriebenen Modell eine große Rolle beim Modell der Laser Verletzung. So wäre es fast unmöglich ohne SHG eine gute und reproduzierbare Laser Verletzung zu erzeugen.

#### **4.3 Durchführung der 2 Photonenmikroskopie**

In den Versuchen dieser Arbeit wird das TrimScope (LaVision Biotech, Bielefeld) verwendet, das an ein aufrechtes Olympus-Fluoreszenz Mikroskop (Tokio, Japan) mit einem 20-Fach

Wasserimmersions-Objektiv (numerischen Apertur 0.95, Olympus) gekoppelt ist. Die Steuerung des 2-Photonenmikrops erfolgt über einen Computer auf dem die Steuerungssoftware Inspector (LaVision Biotech, Bielefeld) installiert ist.

#### 4.3.1 Narkose der Maus

Die Intravitalmikroskopie und das in dieser Arbeit verwendete „Ohrmodell“ bedarf einer Narkose von bis zu 6 Stunden. Eingeleitet wird die Narkose durch eine Inhalationsanästhesie bestehend aus Isofluran 2-3% und Sauerstoff. Dies erfolgt durch einen Verdampfer (Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen, installiert von Völker Vet, Völker GmbH, Kaltenkirchen) der das Gas in einer Körperkammer transportiert, in der sich die Maus befindet. Anschließend wird intraperitoneal die Injektionsnarkose verabreicht. Ziel der Injektionsnarkose ist das Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums III.

Eine optimale Narkose muss folgende Kriterien erfüllen Sedierung, Hypnose, Analgesie und Relaxation. Um dies zu gewährleisten setzt sich die Injektionsnarkose aus drei Inhaltsstoffen zusammen: Midazolam 5,0 mg/kg (Midazolam- ratiopharm®, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe), Medetomidin 0,5mg/kg (Dormitor®, Pfizer GmbH, Karlsruhe) und Fentanyl 0,05mg/kg (Fentanyl-Curamed®, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe). Überprüft wird die ausreichende Narkosetiefe über die Herzfrequenz, Atemfrequenz und Ausbleiben des Flexorreflexes. Das austrocknen der Augen wird durch das Verwenden von Bepanthen Augen und Nasensalbe verhindert (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen).

Um eine physiologische Temperatur aufrecht zu erhalten befindet sich die Maus während der Versuchsvorbereitung auf einer Wärmematte (ThermoLux-Wärmematte, Fa. Dehner) und während des Versuchs auf einer beheizten Vorrichtung.

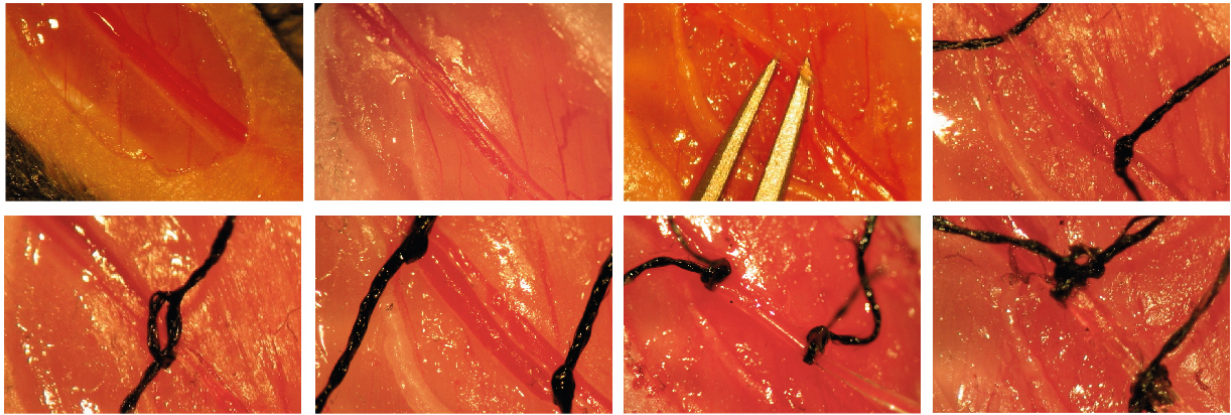
#### 4.3.2 Femoraliskatheter

Um fluoreszierende Farbstoffe zu applizieren wird in die A. femoralis der narkotisierten Maus ein Katheter eingeführt. Die Kathetersieuerung wird an einem mikrochirurgischen Arbeitsplatz, der mit Wärmematte (ThermoLux-Wärmematte, Fa. Dehner) und einem

mikrochirurgischen Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss, Jena) ausgestattet ist, durchgeführt. Die Maus ist auf dem Rücken liegend auf einer Wärmematte, die Beine abgespreizt, fixiert. Dies ermöglicht einen guten Zugang zur Innenseite des Oberschenkels. Die Behaarung an der Innenseite des Oberschenkels der Maus wird rasiert und mittels Enthaarungscreme (Plica® extra soft, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Bülh) enthaart. Anschließend wird der freigelegte Hautbereich desinfiziert (Cutasept®F, Fa.Bode Chemie, Hamburg).

Nach dem Hautschnitt von ca. 5mm Länge proximal des Knies wird die Faszie entfernt (siehe Abbildung 11). Nun wird der Bereich des Hautschnittes freipräpariert (1) und die A. femoralis von V. femoralis und N. femoralis getrennt (2,3). Nach dem die A. Femoralis distal mit einem Faden (Parsalls Limited, Taunton, England) ligiert wird (4), wird ein einfacher Knoten proximal gelegt, der nicht zugezogen wird (5). Anschließend wird mit einer Pinzette zwischen den Knoten ein Aneurysma durch Kompression des Gefäßes erzeugt (6). Mit einer Pinzette fixiert man die A. Femoralis am distalen Knoten und punktiert mit einer braunen Kanüle das Aneurysma. In die so entstandene Öffnung führt man einen Polyethylen-Katheter (Katheterschlauch Portex®, Polythene Tubing, 0,28mm ID, Smiths Medical, Keene, USA) ein (7), der durch festziehen des proximalen Knotens fixiert wird (8). Distal des fixierenden Knotens wird noch ein weiterer Knoten angelegt um den Katheter zusätzlich zu fixieren. Anschließend wird der Katheter mittels NaCl gespült. Der Hautschnitt wird mittels Einzelknopfnäht mit einem monofilen Faden (Prolene® Polypropylen, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Um bei den in vivo Versuchen die Blutgefäße darzustellen kann über den Katheter FITC-Dextran (Fluorescein-Isothiocyanat, 2 Mega-Dalton, Invitrogen, Carlsbad, USA) appliziert werden. FITC hat ein Anregungsmaximum bei 495nm und ein Emissionsmaximum bei 519 nm. Auf Grund der Ausscheidung, Extravasation und reduzierten Fotostabilität muss ca. alle 2 Stunden FITC-Dextran erneut über den Katheter appliziert werden.

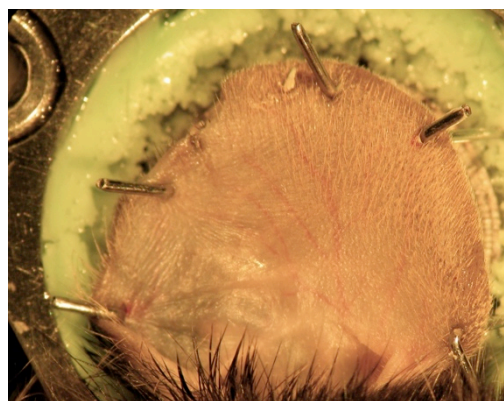




**Abbildung 11 A.Femoralis Katheter**

1. Hautschnitt prox. des Knies, 2. Separierung des A., N. und V. Femoralis, 3. Die separierte A.Femoralis, 4. Distaler Ligatur und prox. Vorlage des Fadens, 5. Vorgelegter prox. Knoten, 6. Aneurysma prox. der dist. Ligatur 6. Einföhren des Katheters in das punktierte Aneurysma, 8. Fixierung des Katheters in der A. Femoralis durch Ligation des prox. Fadens

#### 4.3.3 Ohrmodell



**Abbildung 12: Ohr einer Maus in der Vorrichtung für die 2-Photonen Mikroskopie**

Das Ohrmodell ermöglicht mit relativ wenig Aufwand und minimalinvasiv mikrovaskuläre Strukturen im 2-Photonen Mikroskop darzustellen. Ein weiterer Vorteil ist, dass das Ohr kaum von den Atembewegungen der Maus beeinflusst wird und so ein sehr stabiles Bild möglich ist. Etabliert wurde dieses Modell von Ng et al. [51].

Die narkotisierte Maus wird auf einer speziell gefertigten Halterung in Rückenlage fixiert. Die Halterung verfügt über eine Wärmeplatte, die an eine Warmwasser Pumpe angeschlossen werden muss, um so eine physiologische Temperatur und damit auch die Mikrozirkulation im

Ohr aufrecht zu erhalten. Außerdem verfügt die Halterung über eine Vorrichtung in der das Ohr fixiert werden kann. (siehe Abbildung 12). Die Vorrichtung verfügt über eine Aussparung in die das Ohr hineingelegt werden kann. Um vorzubeugen, dass nach Fixierung des Ohrs Wasser entweicht, wird auf den unteren Rand der Aussparung Silikon (Baysilone-Paste, GE Bayer Silicones, Leverkusen) aufgetragen. Anschließend kann das Ohr in die Vorrichtung gelegt werden. Nach dem das Ohr sich in der Vorrichtung befindet, wird das Ohr mittels umgeknickter Nadeln in dem auf der Innenseite der Vorrichtung befindlichen Gelkissen befestigt. Zu beachten ist, dass das fixierte Ohr plan und ohne Falten ist, da dies die Bild- und Videoqualität negativ beeinflusst. Dies wird mit Hilfe des Stereomikroskops ((Stemi 2000, Zeiss, Jena) kontrolliert. Die nun abgedichtete Vorrichtung wird nun mit 0,9% NaCl befüllt.

#### **4.4 Modelle zur Induktion einer sterilen Inflammation**

In den Versuchen dieser Arbeit werden zwei verschiedene Modelle zur Induktion einer sterilen Inflammation verwendet. Zum einen, die lokale Applikation von chemotaktischen Stoffen (fMLP, TNF- $\alpha$ ). Zum anderen, das Modell der lokalen Laser Verletzung mittels des 2-Photonen Mikroskops, welche auf Grund des zellulären Schadens und der damit verbundenen Freisetzung von DAMPs ebenfalls eine lokale sterile Inflammation erzeugt. Beide Modelle lösen einen chemotaktischen Reiz aus, der eine Extravasation und die Migration von Monozyten und neutrophilen Granulozyten zu Folge hat.

##### **4.4.1 Injektion chemotaktischer Stoffe**

Die Injektion chemotaktischer Stoffe (TNF- $\alpha$  und fMLP) in das Ohr erfolgt unter mikroskopischer Sichtkontrolle subkutan. Um eine lokale sterile Inflammation zu erzeugen werden 30  $\mu$ l TNF- $\alpha$  (600ng, Immuno Tools, Friesoythe) bzw. 30  $\mu$ l fMLP (5mM, PeproTech, Rocky Hill, USA) auf Grund des Volumens an mehreren Stellen im Ohr unter Verwendung einer 29G Kanüle (Micro-Fine, BD, Franklin Lakes, USA) injiziert. Dadurch wird innerhalb des Gewebes kein Gradient erzeugt, sodass ungerichtete interstitielle Migration beobachtet werden kann. Bei den NG2DsRed LysM-eGFP Chimären verwendet man fMLP und die Aufnahmen erfolgen eine Stunde nach Injektion. Bei den NG2DsRed CX<sub>3</sub>CR1-eGFP Chimären wird TNF- $\alpha$  verwendet und die Aufnahmen erfolgen nach 4 Stunden.

#### 4.4.2 Laser Verletzung

Beim Modell der Laser Verletzung welches von Ng et al etabliert wurde, erzeugt man mittels des Laser des 2-Photonen Mikroskops eine standardisierte fokale Gewebsverletzung [51]. Diese wird erzeugt indem mit einer hohen Laserpower (15-20%) bei einer relativ niedrigen Wellenlänge von 800nm für 3-5 Sekunden der Laser auf eine vorher ausgewählte Stelle von ca. 50 x 50µm fokussiert wird. Dies führt auf dem bestrahlten Areal zur Zellnekrose und somit zur Freisetzung von DAMPs. Wichtig für den Erfolg der Laser Verletzung ist eine sorgfältige Auswahl der zu bestrahlenden Stelle. Diese muss vor allem sehr plan sein, was vor allem mit Hilfe des SHG Signal erkannt wird, welches daher auch für die Verletzung besonders wichtig ist.

#### 4.5 Whole Mount Staining

Das entnommene Gewebe wird mit Hilfe von 4% Paraformaldehyd (PFA) 30 min fixiert und anschließend in PBS und 1%igem BSA 5 min bei 4°C mit Hilfe eines Rüttlers (TC-100, Kisker, Steinfurt) gewaschen. Der Vorgang des Waschens wird dreimal wiederholt. Um das Gewebe zu färben legt man es in ein dunkles Reaktionsgefäß und gibt 200µl 1%iges BSA sowieso 4µl Fc-Block (anti-mouse CD 16/32) dazu. Daraufhin kommt es für weitere 30 min in den Rüttler bei 4°C. Anschließend gibt man das zu färbende Gewebe in ein weiteres Reaktionsgefäß und fügt den jeweiligen Antikörper hinzu (siehe Tabelle 2). Nach der Beigabe des Antikörpers wird für weitere 4h bei 4°C inkubiert. Danach wird das Gewebe in einem neuen Reaktionsgefäß zweimal für 15 min mit 300µl PBS sowie 1%igem BSA gewaschen und bis zur endgültigen Verwendung in PBS bei 4°C gelagert. Wenn ein sekundärer Antikörper benötigt wird, wird dieser nach dem Waschen aufgebracht und für 2h bei 4°C inkubiert.

Antigen	Primärantikörper	Klon	Hersteller	Sekundärantikörper	Hersteller
MIF	Rabbit anti-mouse MIF		abcam	Donkey anti-rabbit Alexa488	invitrogen
ICAM-1	Hamster anti-mouse ICAM-1 FITC conjugated	3E2	BD		

**Tabelle 2: Antikörper für Whole Mount Staining**

Die für die Whole Mount Stainings verwendeten Antikörper und ihre jeweiligen Hersteller.

## **4.6 Immunhistologische Färbungen**

### **4.6.1 Grundlagen der immunhistologischen Färbungen**

Das Prinzip der immunhistologischen Färbungen basiert auf der Möglichkeit Antigene in der Zelle oder auf Ihrer Oberfläche sichtbar zu machen. Hierzu wird ein Primärantikörper, welcher unmarkiert ist, anschließend wird Sekundärantikörper, der fluoreszenzmarkiert ist, appliziert. So besteht die Möglichkeit die Schnitte mittels Fluoreszenzmikroskops (DMRB, Leica, Bensheim) darzustellen. Mit einer Kamera (AxioCam, Zeiss, Göttingen) abfotografiert und können durch die Software AxioVision 4.6 (Zeiss, Göttingen) analysiert werden.

### **4.6.2 Vorbereitung der Immunhistologie**

#### **4.6.2.1 Entnahme der Organe für die Immunhistologie**

Die für die Organe benötigte Maus wird in tiefer Isofluran-Narkose durch Fraktur der Halswirbelsäule euthanisiert und die Ohren kopfnah entfernt. Die entfernten Ohren werden in einer 24-Loch Platte unter Verwendung des Mediums für Cryoschnitte (Tissue Tek® OCT Compound, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande) bei -80°C eingefroren und aufbewahrt.

#### **4.6.2.2 Herstellung der Gefrierschnitte**

Das histologische Präparat erfordern dünne Schnitte (3-5 µm), die aus den entfernten Ohren hergestellt werden. Anschließend werden die Schnitte durch Tissue Tek auf einem Stemepel fixiert und mit speziellen Klingen (C35, pfm Medizin AG, Köln), einem Cryotom (Cryotom CM 1850, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) geschnitten und auf einen Objektträger appliziert (Super Frost® Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig). Die Schnitte werden bei -20°C aufbewahrt, um sie anschließend färben zu können.

### **4.6.3 Durchführung der Immunhistologie**

Die Gefrierschnitte werden in die Färbekammer gelegt und anschließend mit einem Fettstift (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) umrandet. Die darauffolgende Fixierung findet

mittels 100 µl 4% igem Paraformaldehyd (PFA) statt. Die Objektträger werden in einer Küvette mit 1% Tween + PBS gewaschen. Bei notwendiger Permeabilisierung wird 1%iges Triton (Triton X-100, Sigma-Aldrich, Steinheim) für 5 -15min verwendet Daraufhin wird mit 100 µl 0,3% BSA + 1:50 bzw. 1:100 Fc-Block (anti-mouse CD 16/32, eBioscience, San Diego, USA) für 20 min die unspezifischen Bindungen ausgeblockt.

Der Objektträger wird auf Zellulose abgeklopft und 100 µl des primären Antikörper, in BSA gelöst und in der notwendigen Konzentration aufpipettiert. Es wird immer ein Objektträger für die Isotypenkontrolle verwendet und einer für die Negativkontrolle (PBS). Es findet eine Inkubation für 1 Stunde im Dunkeln statt und anschließend werden die Objektträger dreimal mit PBS + 1% Tween in einer Küvette gewaschen. Der sekundäre Antikörper (1:200) wird auf alle Objektträger aufgetragen. Es ist notwendig die Objektträgererneut für 1 Stunde im Dunkeln zu inkubieren mit anschließendem dreimal mit PBS + 1% Tween zu waschen. Die Kernfärbung erfolgt für 10 Sekunden mit DAPI (1:3000, 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid, Simga-Aldrich, Steinheim). Daraufhin muss erneut mit PBS + 1%Tween gewaschen werden und ein Tropfen Mounting Medium und anschließend ein Deckgläschen (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs- GmbH, Braunschweig) appliziert werden. Nach Abschluss der Trocknungsphase können die Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

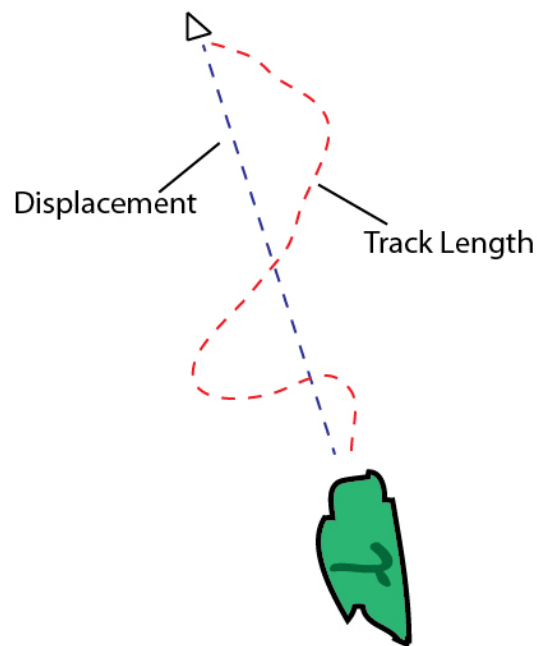
Antigen	Primärerantikörper	Hersteller	Sekundärerantikörper	Hersteller
MIF	rabbit anti-mouse MIF	abcam	Donkey anti-rabbit Alexa488	Invitrogen
NG2	rabbit anti-NG2	R&D Chemicon	Goat anti-rabbit Alexa 594	Invitrogen

**Tabelle 3: Konzentrationen der primären und sekundären Antikörper**

Die für die Immunhistologie verwendeten Antikörper und ihre jeweiligen Hersteller.

#### 4.7 Parameter zur interstitiellen Migration

Die Migrationsmuster von Zellen zu analysieren bedarf es einiger Parameter, die hier im Folgenden erläutert werden.



**Abbildung 13 Unterschied zwischen Displacement und Track Length bei der Migration von Immunzellen**

#### **4.7.1 Track Length**

Die Track Length gibt die von der Zelle wirklich zurückgelegte Strecke an (siehe Abbildung 13).

#### **4.7.2 Displacement**

Das Displacement ist die Strecke zwischen Start und Zielpunkt und gibt somit den direktesten Weg an (siehe Abbildung 13).

#### **4.7.3 Velocity**

Die Geschwindigkeit wird in dieser Arbeit  $\mu\text{m} / \text{Sekunde}$  angegeben.

#### **4.7.4 Track Velocity**

Ist die durchschnittliche Geschwindigkeit eines Tracks in  $\mu\text{m} / \text{Sekunde}$ .

#### **4.7.5 Meandering Index**

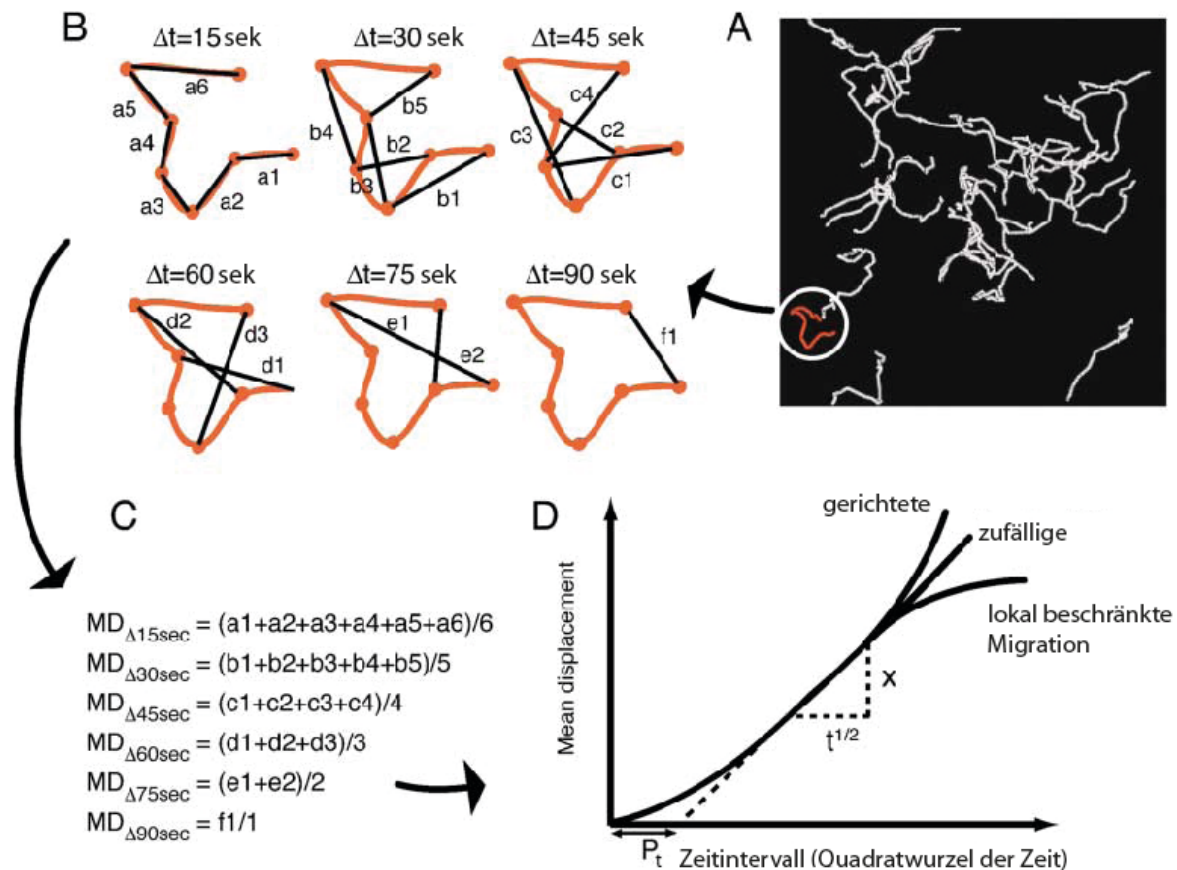
Der Meandering Index oder auch Straightness Index ist  $\text{Displacement} / \text{Track length}$ . Der Wert muss somit zwischen 0 und 1 liegen. 0 würde bedeuten, dass die Zelle sich komplett im Kreis bewegt und der Startpunkt dem Zielpunkt entspricht. 1 wäre der direkteste mögliche Weg, also eine perfekte Gerade.

#### **4.7.6 Displacement Rate**

Ist das  $\text{Displacement} / (\text{Dauer des Tracks})$ . Es gibt somit das durchschnittliche Displacement pro min. des Tracks an.

#### **4.7.7 Mean Displacement Plot**

Mit Hilfe der Berechnung des Mean Displacement Plot kann zwischen zufälliger und gerichteter Migration unterschieden werden. Er errechnet sich durch das mittlere Displacement der Zellen geteilt durch die Quadratwurzel der Zeit [100].



**Abbildung 14: Mean Displacement Plot Schema und Berechnung**

Der Mean Displacement Plot beinhaltet sowohl Geschwindigkeit als Direktionalität der Zellmigration. A) Beispiel eines Pfades einer 3D getrackten Zelle. Der Track besteht aus 6 in Folge aufgenommenen Bildern. B) Der Migrationspfad wird in seine einzelnen Koordinaten zerlegt und dann in neue Vektoren, die ein direktes Displacement haben, unterteilt für die jeweiligen Zeitpunkte C) Die aus B) resultierende Formel wird nun für alle Pfade berechnet. D) Die gewonnen Werte(Y-Achse) werden gegen die Quadratwurzel der Zeit (X) Achse aufgetragen. Die zunächst exponentielle Steigung (P) folgt daraus, dass die Zellen zunächst in eine gemeinsame präferierte Richtung migrieren bevor sie ihre Richtung ändern. Der gemeinsame lineare Teil des Graphen resultiert aus einer zufälligen Migration bei ungefähr gleicher Migrationsgeschwindigkeit, vergleichbar mit der Brownschen Bewegung. Wenn nun die Steigung on ein Plateau übergeht, spricht dies für eine physikalische oder biologische Restriktion auf ein Areal. Nimmt die Steigung jedoch nach dem linearen Abschnitt wieder exponentiell zu spricht, dies für eine gerichtete Migration in Folge eines vorliegenden Stimulus, welcher chemotaktisch wirkt. Modifiziert nach Sumen et al [101].

#### 4.7.8 Motility Coefficient

Der Motility Coefficient gibt die Fähigkeit an ein bestimmtes Areal zu scannen und so kann eine Aussage über die Fähigkeit der Überwachung des Immunsystems im Gewebe getroffen



werden. Auch hier wird das Displacement der Zelle berücksichtigt und die dafür benötigte Zeit.  $\text{Motility Coefficient} = \text{Displacement}^2 / t$ . Vergleichbar mit dem Diffusions Coefficienten[101].

#### **4.7.9 Autotracking**

Das Autotracking also die automatische Positionsbestimmung der Zellen erfolgte mit der Software Volocity (Improvision, Waltham, USA). Dabei erkennt die Software automatisch die neutrophilen Granulozyten oder Monozyten anhand ihrer Fluoreszenz und Größe. So kann die Software die Position der Zellen bestimmen und weist ihnen zu jedem Zeitpunkt der Aufnahme Koordinaten zu. Als weitere Informationen erhält man u.a. die Geschwindigkeit der Zellen

#### **4.7.10 Heatmap**

Die Heatmap wird mittels der Software Matlab (MathWorks Inc., Natick, USA) unter Verwendung eines Skriptes, das die Abstände der Zellen untereinander ermittelt. Je geringer die Abstände der Zellen untereinander desto mehr Zellen befinden sich folglich in einem Areal, also liegt dort eine höhere Zelldichte vor. Je nach Dichte wird dem Areal eine bestimmte Farbe zugewiesen. Die so gewonnene Heatmap wird anschließend mit Hilfe von Photoshop (Adobe Systems, San Jose, USA) über die Aufnahmen des Zwei-Photonen-Mikroskops gelegt.

#### **4.7.11 Overlap Coefficient**

Der Overlap Coefficient misst die Überlagerung von Voxeln in verschiedenen Kanälen. In dieser Arbeit wurde verwendet um die Interaktionen zwischen myeloiden Leukozyten und NG2+Perizyten zu verifizieren, da wenn es zu einer Überlagerung kommt, zwangsläufig ein physischer Kontakt zwischen den Zellen besteht.

#### **4.7.12 Time to Target**

Time to Target misst die Zeit, die ein myeloider Leukozyt braucht um sein Ziel, in diesem Fall einen sterilen Inflammationsfokus, zu erreichen. Somit lässt sich vergleichen ob interagierende oder nicht interagierende myeloide Leukozyten schneller die Inflammation im Gewebe erreichen

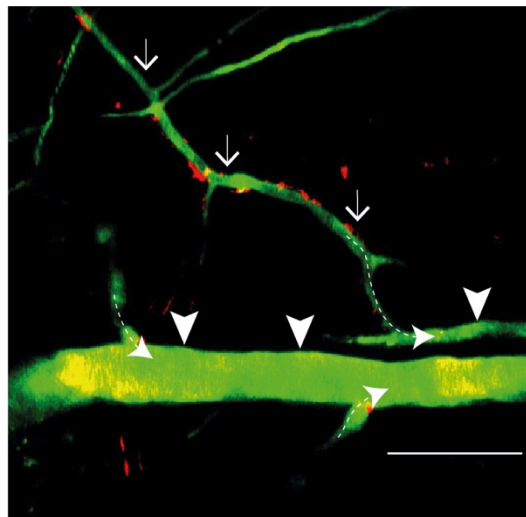
#### **4.7.13 Statistische Auswertung**

Die statistischen Auswertungen der Versuche in dieser Arbeit wurden mit verschiedenen Programmen durchgeführt, die im folgenden genannt werden. Es wurde SigmaPlot 11.0 (Systat, Erkrath) und SPSS Statistics (IBM, Ehningen) zur Bestimmung der Werte verwendet. Die so bestimmten Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  s.e.m graphisch dargestellt oder wenn es sich um Einzelwerte handelte als Dot Plots. Sofern es sich um normal verteilte Werte handelte, wurde der p-Wert mittels T-Test bestimmt. Wenn es sich um nicht normal verteilte Werte handelte, wurde bei zwei Gruppen der Mann-Whitney-U-Test verwendet, bei mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Für die statistische Signifikanz gilt ein p-Wert von  $< 0,05$ .

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Lokalisation der Perizyten in der NG2DsRed Maus

Um die Gefäße der Maus darzustellen und um die Lokalisation der NG2<sup>+</sup>DsRed-Perizyten zu bestimmen, wurde der NG2DsRed Maus über den A. femoralis Katheter FITC-Dextran appliziert um die Gefäße im 2-Photonen Mikroskop visualisieren zu können (siehe Methoden). Auf Grund der unterschiedlichen Fluoreszenzen der NG2<sup>+</sup> Zellen und von FITC-Dextran lässt es sich gut zwischen NG2<sup>+</sup> Zellen und den Gefäßen differenzieren. Anhand der Flussgeschwindigkeit und der Flussrichtung in den Gefäßen kann zwischen Venolen und Arteriolen unterschieden werden.



**Abbildung 15: Lokalisation der NG2<sup>+</sup> Perizyten in vivo**

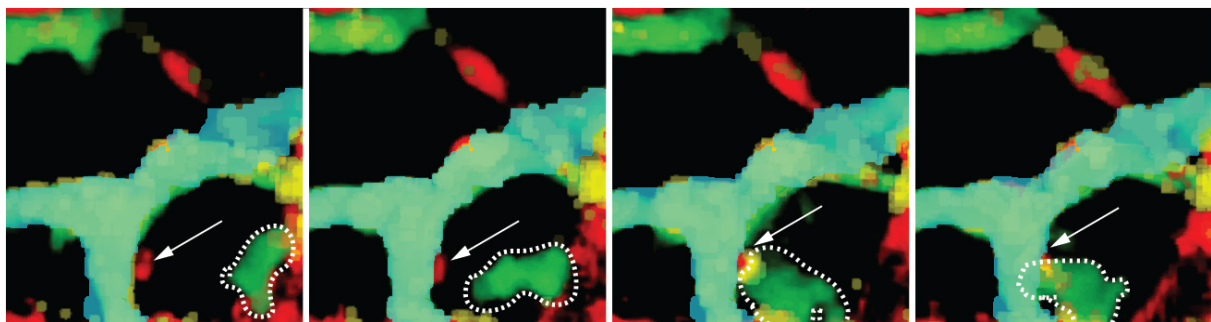
Intravitale Aufnahme des 2-Photonen Mikroskops um die Lokalisation der NG2<sup>+</sup> Perizyten am Blutgefäß zu visualisieren; in grün zeigt sich ein Blutgefäß (FITC-Dextran), in rot die Perizyten, NG2<sup>+</sup> Perizyten befinden sich an Kapillaren (Pfeile), jedoch nicht an Venolen (Pfeilspitzen). Gestrichelte Pfeile stellen die Richtung des Blutflusses dar. Maßstab = 50µm. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

In Abbildung 15 ist zu sehen, dass die roten NG2<sup>+</sup> Zellen um das Gefäß liegen. Da anhand der Flußgeschwindigkeit und Flussrichtung zwischen Arteriolen und Venolen unterscheiden werden konnte, konnte so gezeigt werden, dass NG2<sup>+</sup> Zellen sich ausschließlich an Arteriolen und Kapillaren befinden.

## 5.2 Interaktion zwischen Perizyten und myeloiden Leukozyten bei interstitieller Migration

In den vorherigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten ausschließlich an Arteriolen und Kapillaren liegen. Anschließend wurde untersucht welche Funktion NG2<sup>+</sup> Perizyten bei steriler Inflammation haben. Dazu wurde ihr Einfluss auf die interstitielle Migration von myeloiden Leukozyten untersucht. Um eine sterile Inflammation zu induzieren wurde NG2DsRed–CX<sub>3</sub>CR1eGFP Knochenmarkchimären der chemotaktisch wirksame Stoff TNF- $\alpha$  s.c. in das Ohr injiziert.

Die Injektion von TNF- $\alpha$  an mehreren Stellen im Ohr induziert eine diffuse sterile Inflammation in der Haut des Ohrs ohne einen Gradienten im Gewebe herzustellen. Dies löst eine Inflammationskaskade aus an deren Ende die Extravasation von myeloiden Leukozyten steht. Auf die Extravasation folgt die interstitielle Migration von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen und hier wurde mittels intravitaler 2-Photonenmikroskopie untersucht, ob es zu Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten kommt. Tatsächlich kam es während der interstitiellen Migration der CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen zu dynamische Interaktion mit vor allem kapillären NG2<sup>+</sup> Perizyten (siehe Abbildung 16).

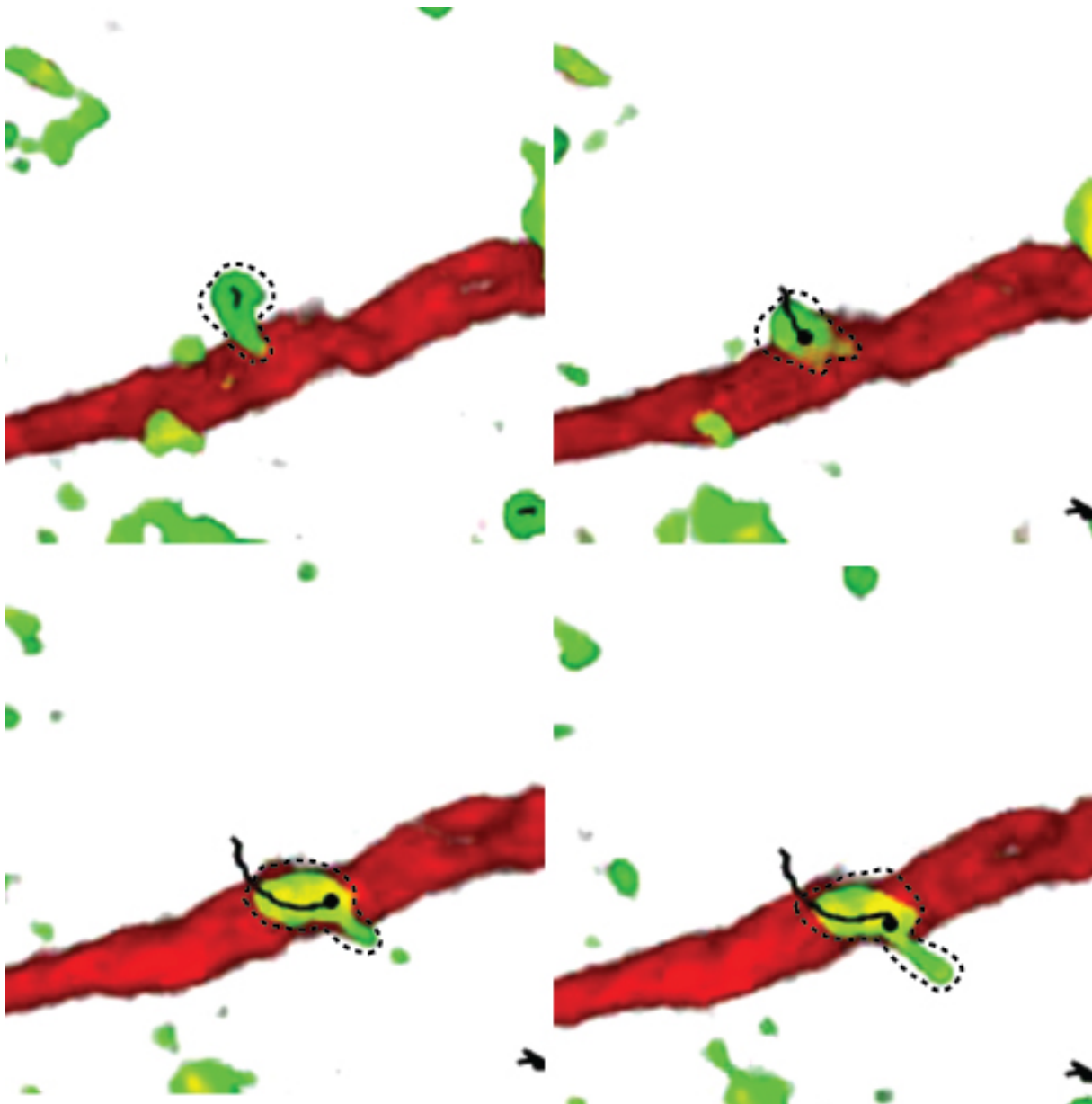


**Abbildung 16: Migration und Colocalization eines Makrophagen nach Induktion einer sterilen Inflammation**

Zeitfolge von intravitalen 2-PM Bildern im Ohr von NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1GFP Chimären 4.5h nach TNF- $\alpha$  Injektion. Makrophage (grün, mit gepunkteter Umrandung markiert) in Interaktion mit einem Perizyten (rot, mit Pfeil gekennzeichnet), der sich an einer Kapillare (Türkis) befindet. Die Colocalisation (gelb) kennzeichnet die Interaktion beider Zelltypen. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

In Abbildung 16 ist zu sehen wie ein CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophage gezielt zu einem NG2<sup>+</sup> Perizyten migriert und mit diesem interagiert. Die Interaktion dauerte ca. 15 min bis sich der Makrophage anschließend löst. Es ist deutlich die Interaktion zwischen Makrophage und Perizyt anhand der gelb erscheinenden Colocalization zu erkennen.

Um zu überprüfen ob Interaktion auch zwischen  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten und  $\text{NG2}^+$  Perizyten *in vivo* stattfindet, wurden  $\text{NG2DsRed-LysMeGFP}$  Chimären verwendet (siehe Methoden). Diesen wurde s.c. das chemotaktisch wirksame Molekül fMLP in das Ohr s.c. injiziert, was eine diffuse sterile Inflammation in der Haut des Ohrs induziert und die Rekrutierung von  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten zur Folge hat..



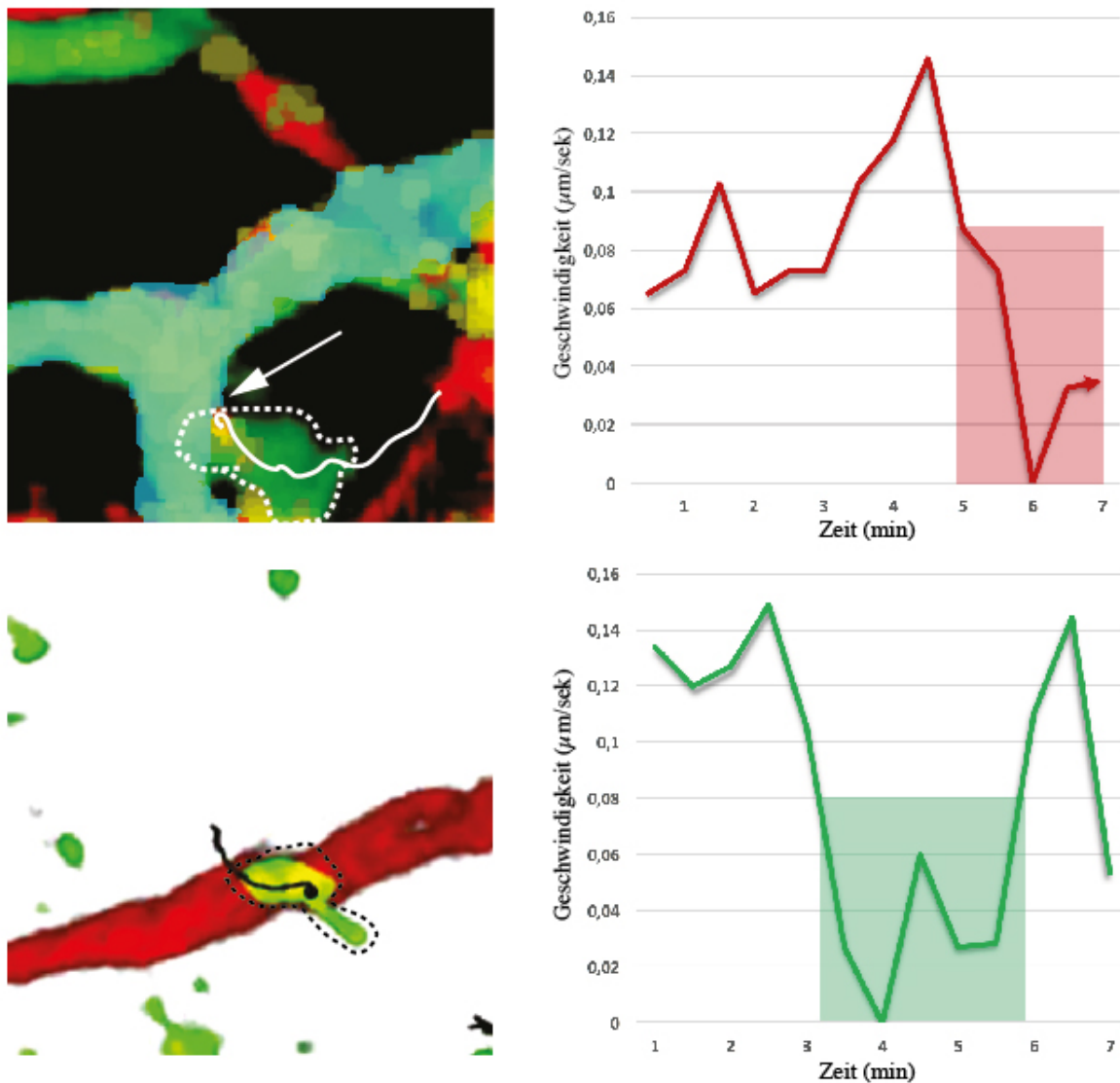
**Abbildung 17: Interaktion von einem  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten mit einem  $\text{NG2}^+$  Perizyten bei steriler Inflammation**

Zeitfolge von intravitalen 2-PM Bildern im Ohr von  $\text{NG2DsRed-LysMeGFP}$  Chimären 1.5h nach fMLP Injektion. In Richtung Perizyten polarisierter neutrophiler Granulozyt (grün, mit gepunkteter Umrandung markiert,

schwarze Linie markiert den Migrationspfad) in Interaktion mit einem Perizyten (rot). Die Coloaliation (gelb) kennzeichnet die Interaktionen. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

Im Rahmen der interstitiellen Migration der  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten kam es wie bei den vorherigen Experimenten mit  $\text{CX}_3\text{CR1}^+$  Makrophagen zu dynamischen Interaktionen mit  $\text{NG2}^+$  Perizyten (siehe Abbildung 17).

Anschließend wurden die Interaktion zwischen myeloiden Leukozyten und  $\text{NG2}^+$  Perizyten genauer untersucht. Dazu wurde die Migration und die Interaktion zwischen den  $\text{NG2}^+$  Perizyten und den myeloiden Leukozyten mit Hilfe der Analysesoftware Volocity untersucht. Die Migrationsgeschwindigkeit der myeloiden Leukozyten vor nach und während der Interaktion wurde untersucht, außerdem wurde die Anzahl und Dauer der Interaktionen zwischen  $\text{NG2}^+$  Perizyten quantifiziert.



**Abbildung 18: Interstitielle Migration von myeloiden Leukozyten und ihrer Migrationsprofile**

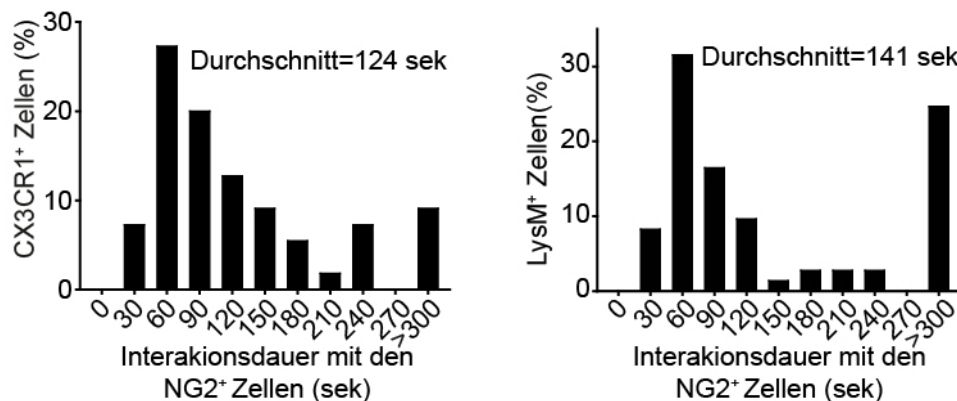
Oben: Interstitielle Migration von  $CX_3CR1^+$  Makrophagen dargestellt mittels 2-Photonen-Mikroskopie in einer NG2DsRed- $CX_3CR1eGFP$  Chimäre 4 h nach s.c. Injektion von  $TNF-\alpha$  in das Ohr der Chimäre. Track der  $CX_3CR1^+$  Makrophagen (grün, mit gepunkteter Linie umrandet), die mit einem  $NG2^+$  Perizyten (rot) interagiert. 1 kennzeichnet den analysierten Track. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.

Unten: Interstitielle Migration von  $LysM^+$  neutrophilen Granulozyten dargestellt mittels intravitaler 2-Photonen-Mikroskopie in einer NG2DsRed- $LysMeGFP$  Chimäre 2 h nach s.c. Injektion von fMLP in das Ohr der Chimäre. Track eines  $LysM^+$  neutrophilen Granulozyten (grün, mit gepunkteter Linie umrandet), die mit einem  $NG2^+$  Perizyten (rot) interagiert. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.

Das Tracking der myeloiden Leukozyten in Abbildung 18 zeigt, dass es während der Interaktion zu einer deutlichen verringerten Geschwindigkeit bis hin zum Arrest kommt. Die

Interaktion definiert sich einerseits über die reduzierte Geschwindigkeit und über die Colocalization von NG2<sup>+</sup> Zellen und myeloiden Leukozyten.

Anschließend wurden die Interaktionsdauer zwischen myeloiden Leukozyten und NG2<sup>+</sup> Perizyten bei steriler Inflammation genauer untersucht. Zunächst wurden die Interaktionen zwischen NG2<sup>+</sup> Perizyten und LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten untersucht. Dazu wurde mittels s.c. Injektion von fMLP in das Ohr von NG2DsRed-LysMeGFP Chimären eine diffuse sterile Inflammation in der Haut des Ohrs induziert.



**Abbildung 19: Interaktionsdauer von myeloiden Leukozyten bei steriler Inflammation**

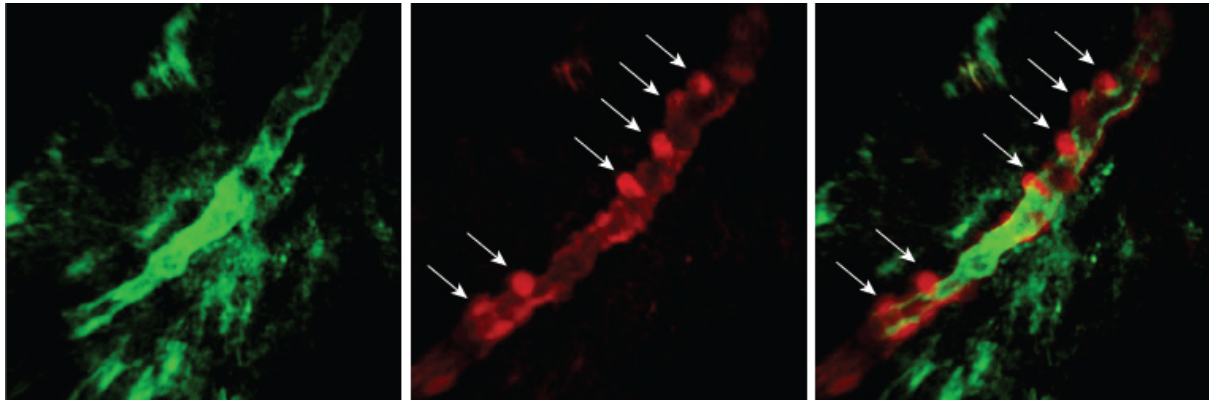
Quantifizierung der Interaktionsdauer von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen (links) oder LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten (rechts) und NG2<sup>+</sup> Perizyten in einer NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1eGFP bzw. einer NG2DsRed LysMeGFP Chimäre. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

Dabei lassen sich in Abbildung 19 zwei unterschiedliche Typen von Interaktionen zwischen myeloiden Leukozyten und NG2<sup>+</sup> Perizyten unterscheiden. Kurze Interaktionen unter 2min und lange über 5min.

### 5.3 Vermittlung der Adhäsion der myeloiden Leukozyten mit NG2<sup>+</sup> Perizyten durch ICAM-1



Da die Geschwindigkeitsprofile sowie die Colokalisation auf eine adhäsive Interaktion zwischen Perizyten und interstitiellen myeloiden Immunzellen hindeuten, wurde genauer untersucht wie diese Interaktion vermittelt wird. Dafür wurden Whole Mount Stainings durchgeführt um zu überprüfen ob das mit Inflammationen assoziierte Adhäsionsmolekül ICAM-1 von Perizyten exprimiert wird.



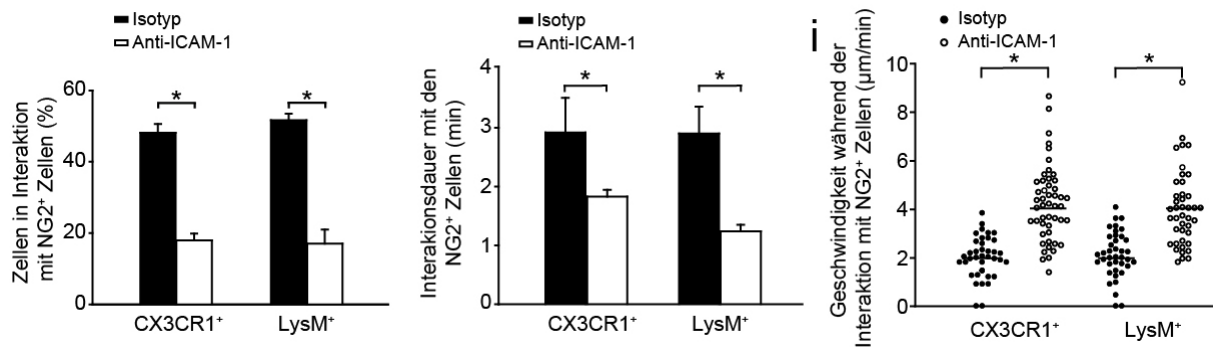
**Abbildung 20: Expression von ICAM-1 von NG2<sup>+</sup> Perizyten**

Expression von ICAM-1(grün) auf NG2<sup>+</sup> Perizyten(rot, Pfeile) und Endothelzellen in der Haut nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  über 6 Stunden. 3D-Aufnahme mittels 2-Photonen Mikroskopie. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

Im Whole Mount Staining Abbildung 20 ist deutlich zu sehen wie ICAM-1 an der Oberfläche der NG2<sup>+</sup> Perizyten exprimiert wird.

Nachdem gezeigt wurde, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten das Adhäsionsmolekül ICAM-1 exprimieren, wurde untersucht ob die Interaktion zwischen NG2<sup>+</sup> Perizyten und myeloiden Leukozyten ICAM-1 abhängig ist.

Hierfür wurden *in vivo* Experimente mit einem ICAM-1 Antikörper sowie einer Isotyp-Kontrolle durchgeführt. Dazu wurde im Ohr von NG2DsRed-LysMeGFP Chimären fMLP s.c. appliziert, gefolgt von der Antikörperinjektion im Abstand von 30min, womit vor allem die interstitielle Migration und nicht die Extravasation der LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten beeinträchtigt wird. Die ablaufende interstitielle Migration wurde mittels 2-Photonenmikroskopie visualisiert und mit Hilfe von Volocity analysiert. Die gleichen Experimente wurden auch mit NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1 Chimären durchgeführt. Eine sterile Inflammation im Ohr der Maus wurde mittels TNF- $\alpha$  Injektion erzeugt und nach einer Wartezeit der ICAM-1 Antikörper injiziert.



**Abbildung 21: Einfluss von anti-ICAM-1 Antikörpern auf die Interaktion zwischen myeloiden Leukozyten und NG2<sup>+</sup> Perizyten**

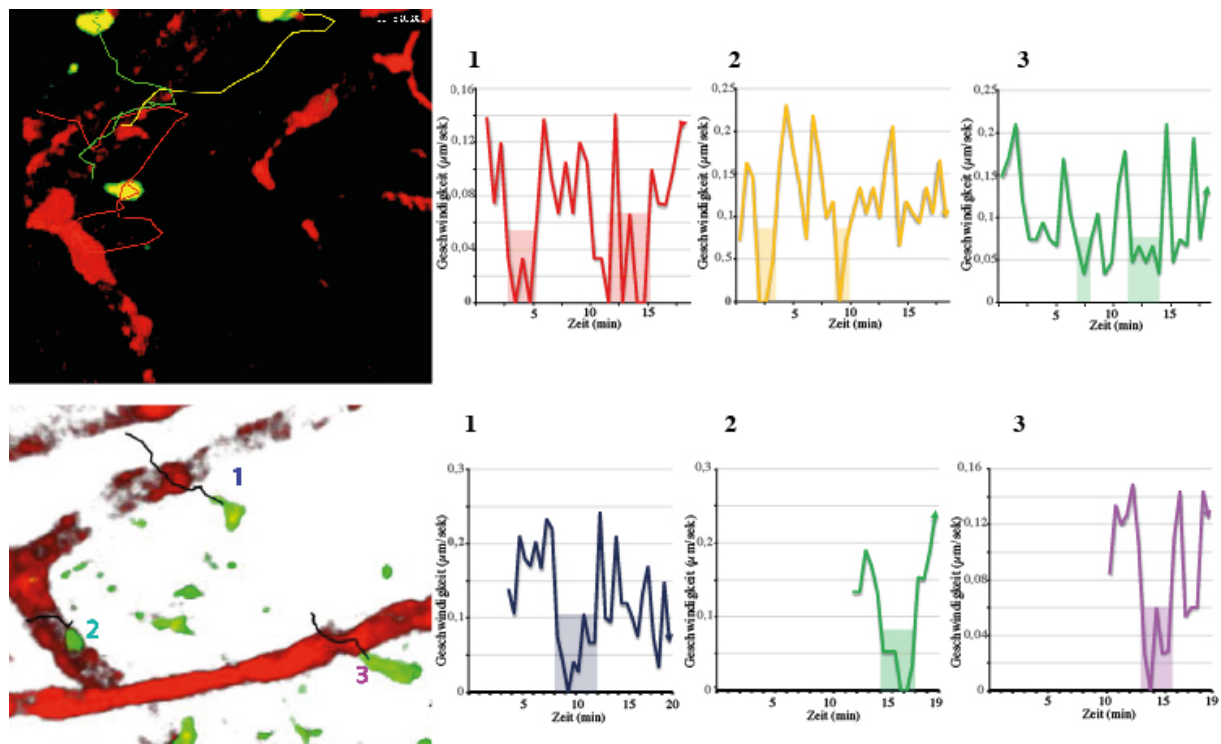
(Links) Quantifizierung der Anzahl der myeloiden Leukozyten in Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten bei Injektion von Isotyp bzw. anti-ICAM-1 Antikörpern, (mitte) Quantifizierung der Interaktionsdauer der myeloiden Leukozyten mit NG2<sup>+</sup> Perizyten bei Injektion von Isotyp bzw. anti-ICAM-1 Antikörpern, (rechts) Geschwindigkeit der myeloiden Leukozyten bei Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten bei Injektion von Isotyp bzw. anti-ICAM-1 Antikörpern. Alle Experimente in NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1eGFP bzw. NG2DsRed-LysMeGFP Chimären. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.

Nach Injektion des anti-ICAM-1 Antikörpers kommt es zu einer massiven Reduktion der Interaktionen zwischen NG2<sup>+</sup> Perizyten und myeloiden Leukozyten. Während in der Kontrolle noch ungefähr 50% der myeloiden Leukozyten interagiert haben, sind es nach Injektion des ICAM-1 Antikörpers nur noch 20%.

Auch die Dauer der Interaktion zwischen myeloiden Leukozyten und den NG2<sup>+</sup> Perizyten hat sich signifikant verkürzt. Nach Injektion des ICAM-1 Antikörpers bleibt die starke Reduzierung der Migrationsgeschwindigkeit der myeloiden Leukozyten während der Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten aus. Dies zeigt, dass es zu adhäsiven Interaktion, vermittelt durch ICAM-1, zwischen NG2<sup>+</sup> Perizyten und myeloiden Leukozyten während der interstitiellen Migration kommt.

#### 5.4 Chemotaktische Wirkung von NG2<sup>+</sup> Perizyten auf myeloide Leukozyten

Da oben gezeigt werden konnte, dass es bei steriler Inflammation zu adhäsiven Interaktionen zwischen NG2<sup>+</sup> Perizyten und interstitiellen myeloiden Leukozyten kommt, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob es sich hierbei um zufällige oder gezielte Interaktionen handelt.



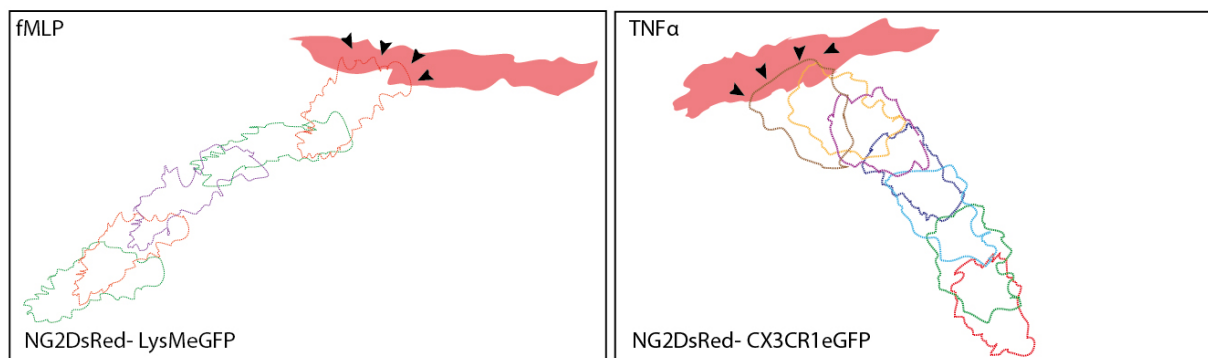
**Abbildung 22: Interstitielle Migration von myeloiden Leukozyten bei steriler Inflammation mit Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten und ihre Migrationspfade**

Oben: Interstitielle Migration von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen visualisiert mittels *in vivo* 2-PM in einer NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1eGFP Chimäre 4h nach s.c. Injektion von TNF- $\alpha$  in das Ohr der Chimäre. Makrophagen von 1-3 nummeriert und in Interaktion mit Perizyten. Die roten, gelben und grünen Tracks kennzeichnen die Migrationspfade der Makrophagen und korrespondieren mit der jeweiligen Geschwindigkeitskurve.

Unten: Interstitielle Migration von neutrophilen Granulozyten mittels *in vivo* 2-PM in einer NG2DsRed-LysMeGFP Chimäre 2h nach s.c. Injektion von fMLP in das Ohr der Chimäre. Neutrophile Granulozyten von 1-3 nummeriert und in Interaktion mit Perizyten. Die Tracks kennzeichnen die Migrationspfade der neutrophilen Granulozyten und korrespondieren mit der jeweiligen Geschwindigkeitskurve. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

Einen ersten Hinweis auf eine aktive Interaktion liefern die Geschwindigkeitsprofile der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, da bei Annäherung an die Perizyten eine deutliche Beschleunigung der Migration feststellbar ist. So zeigt Abbildung 22, dass es während die myeloiden Leukozyten in Richtung der NG2<sup>+</sup> Perizyten migrieren, zu einer Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit kommt.

Zudem war während der Migration von myeloiden Leukozyten in Richtung der Perizyten nicht nur eine Erhöhung der Geschwindigkeit, sondern auch eine deutliche Polarisierung der Immunzellen mit Ausbildung von Pseudopodien in Richtung der NG2<sup>+</sup> Perizyten auffällig (siehe Abbildung 23).



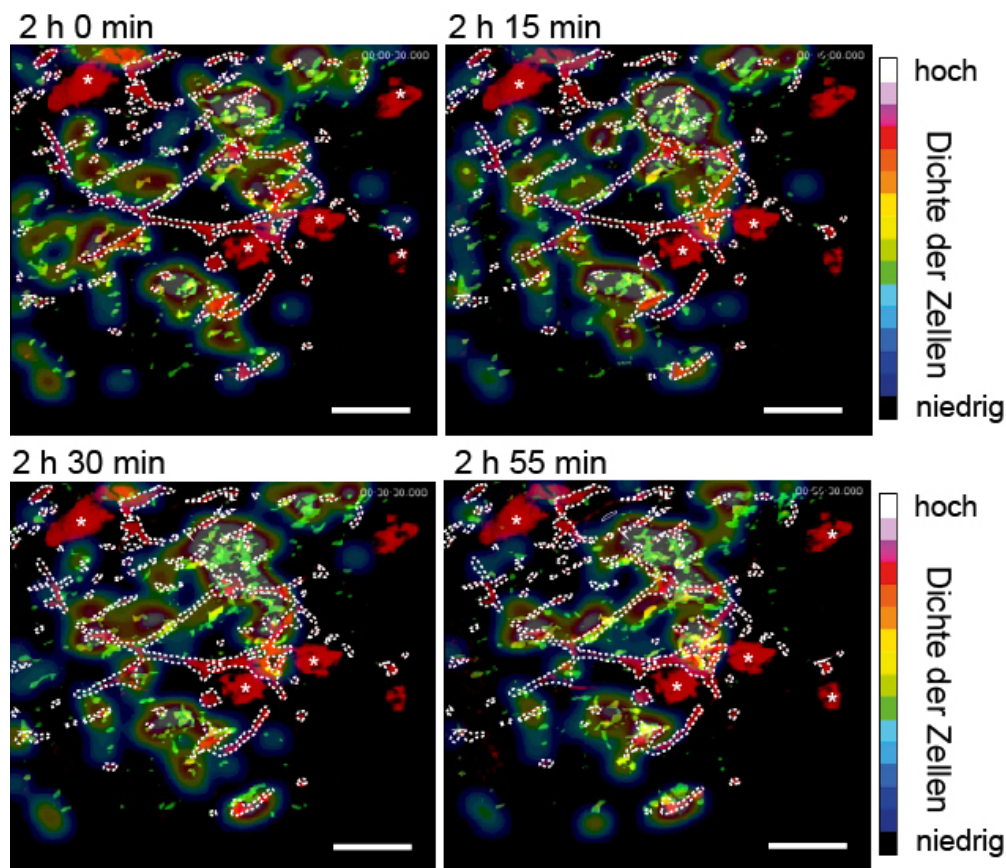
**Abbildung 23: Ausbildung von Pseudopodien von myeloiden Leukozyten in Richtung von NG2<sup>+</sup>Perizyten**

Zeitliche Überlagerung der Umrisse von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten (links) und CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen (rechts) während der Migration zu einem NG2<sup>+</sup> Perizyten. Erstellt mittels intravitaler 2-PM bei einer Aufnahmezeit von zwei Bildern pro Minute nach Injektion von TNF- $\alpha$  respektive fMLP in NG2DsRed-LysMeGFP/-CX<sub>3</sub>CR1eGFP Chimären. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass dynamische Interaktionen zwischen myeloiden Leukozyten und NG2<sup>+</sup> Perizyten stattfinden. Es kommt außerdem zu einer Akzeleration der myeloiden Leukozyten bei Migration zu den NG2<sup>+</sup> Perizyten sowie zu einer Polarisation der myeloiden Leukozyten in Richtung der NG2<sup>+</sup> Perizyten. Diese gewonnen Erkenntnisse sprechen für einen chemotaktischen Stimulus, der von den NG2<sup>+</sup> Perizyten ausgeht und auf die myeloiden Leukozyten wirkt.

Um zu überprüfen wie NG2<sup>+</sup> Perizyten *in vivo* auf myeloide Leukozyten im entzündeten Gewebe chemotaktisch wirken, wurde s.c. fMLP in das Ohr von NG2DsRed-LysMeGFP Chimären injiziert, was eine diffuse sterile Inflammation induziert (siehe Methoden).

Nach Rekrutierung der LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gewebe wurde ihr Migrationsverhalten auf der Ebene von Zellpopulationen analysiert und ihre Verteilung und Dichte im Gewebe mit Hilfe einer Heatmap (siehe Methoden) bestimmt.

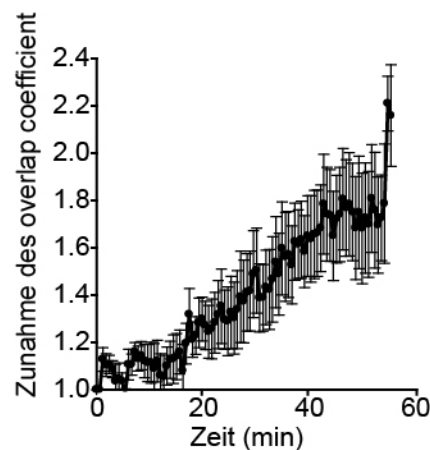


**Abbildung 24: Heatmap von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten nach fMLP Injektion**

Darstellung der Verteilung von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten mittels Heatmap in einer NG2DsRed-LysMeGFP Chimäre 2h nach fMLP Injektion. Farbverlauf von niedriger (schwarz-blau) zu hoher Dichte der LysM<sup>+</sup> Zellen(rot-weiß). Gefäße mittels gestrichelter Umrandung markiert. Haarfollikel sind mit „\*“ gekennzeichnet. Maßstab 100µm. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

In der Heatmap (Abbildung 24) ist die Verteilung der LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten zu sehen. Zu Beginn der sterilen Inflammation sind die LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten diffus im Interstitium verteilt. Dies ist vor allem anhand der großflächigeren blauen Areale zu erkennen. Im Verlauf kommt es zu einer zunehmenden perivaskulären Lokalisation der LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Das heißt die LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten migrieren im Verlauf zu den NG2<sup>+</sup> Perizyten und vor allem migrieren sie in direkter Umgebung an den NG2<sup>+</sup> Perizyten entlang. Sie nutzen diese als Leitstruktur. In der Heatmap ist dies an den roten und orangen Flächen in direkter Umgebung der NG2<sup>+</sup> Perizyten zu erkennen.

Um die Akkumulation der LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten an den NG2<sup>+</sup> Perizyten zu quantifizieren wird hier der Overlap Coefficient verwendet. Dieser misst die Colocalization des grünen eGFP Signals und den roten DsRed Signals (siehe Methoden).



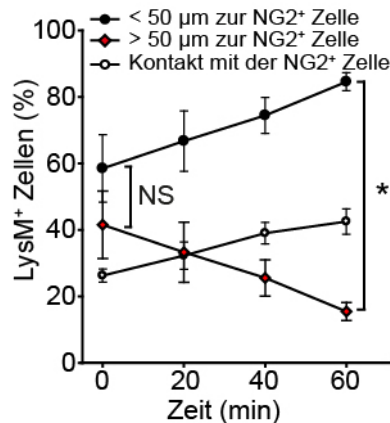
**Abbildung 25: Overlap Coefficient von LysMeGFP Zellen und NG2dsRed Zellen nach fMLP Injektion**

Overlap Coefficient vom grünen (LysMeGFP) und roten (NG2DsRed) Signal über eine Stunde, 2h nach fMLP Injektion. Werte auf den Anfangswert normalisiert. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

Es ist eine deutliche Zunahme der Colocalisation über die Zeit in Abbildung 25 zu sehen. Dies bedeutet, dass während der sterilen Inflammation immer mehr LysM<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten zu den NG2<sup>+</sup> Perizyten migrieren und mit diesen in Kontakt stehen, was im Endeffekt zur Zunahme des Colocalisationssignals führt.

Die Quantifizierung und Positionsbestimmung der LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten *in vivo* (siehe Methoden) bietet die zusätzliche Möglichkeit zu differenzieren ob eine direkte Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Perizyten stattfindet oder ob sich die LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten im perivaskulären Raum also in direkter Umgebung der NG2<sup>+</sup> Perizyten aufhalten. Die 2-Photonenmikroskopaufnahmen wurde mittels Volocity analysiert und LysM<sup>+</sup> neutrophilen getrackt und ihr Abstand zu den NG2dsRed Perizyten bestimmt (siehe Methoden).

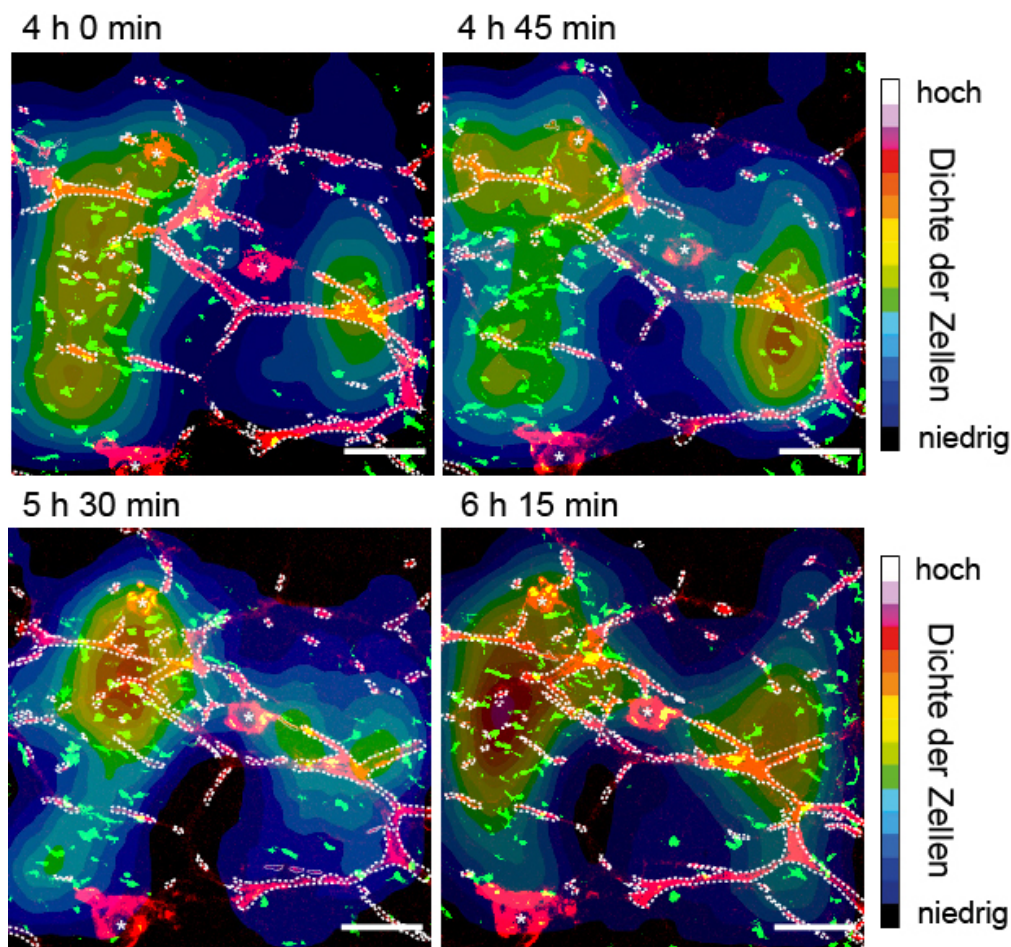




**Abbildung 26: Abstand zwischen LysM<sup>+</sup> Zellen und NG2<sup>+</sup>Perizyten**

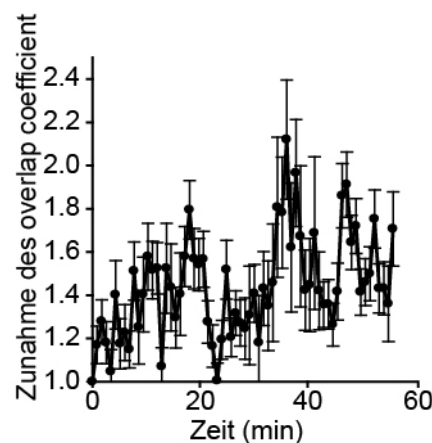
Quantifizierung von LysM<sup>+</sup> Zellen die sich innerhalb oder außerhalb eines 50µm Radius zu den Perizyten befinden oder mit diesen interagieren 2-3h nach fMLP Injektion über die Zeit. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.

Übereinstimmend mit der automatisierten Bestimmung des Overlap Coefficient zeigte sich, dass es im Verlauf zu einer Zunahme der Kontakte zwischen LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten und NG2<sup>+</sup> Perizyten kommt. Außerdem nimmt die Zahl der perivaskulären LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten, die nicht weiter als 50µm von den NG2<sup>+</sup> Perizyten entfernt sind, deutlich zu. Während die LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten zu Beginn noch zufällig im Gewebe verteilt sind, entstehen im Verlauf zwei Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden: LysM<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten, die dichter als 50µm zu einem NG2<sup>+</sup> Perizyten lokalisiert sind und denen die weiter als 50µm entfernt sind. Zudem wurden auch NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1GFP Chimären verwendet bei welchen im Ohr mittels s.c. Injektion von TNF- $\alpha$  eine diffuse sterile Inflammation erzeugt wurde. Anschließend wurde Akkumulation von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen an NG2<sup>+</sup> Perizyten mit Hilfe von Heatmap, Overlap Coefficient und Positionsbestimmung untersucht. Hier ergeben sich ähnliche Befunde wie bei den neutrophilen Granulozyten mit Akkumulation der CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen um die NG2<sup>+</sup> Perizyten, nur dass der Prozess über einen längeren Zeitraum abläuft (siehe Abbildung 27, Abbildung 28, Abbildung 29). Die durchgeführten Experimente weisen darauf hin, dass bei steriler Inflammation von den NG2<sup>+</sup> Perizyten ein chemotaktischer Stimulus auszugehen könnte. Dieser führt dazu, dass die myeloiden Leukozyten nach Extravasation im perivaskulären Raum akkumulieren und mit den NG2<sup>+</sup> Perizyten auch direkt interagieren.



**Abbildung 27: Heatmap von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen nach TNF- $\alpha$  Injektion**

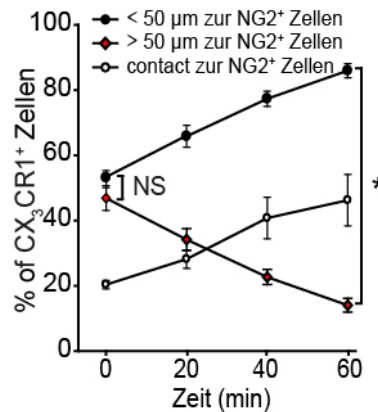
Darstellung der Verteilung von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen mittels Heatmap in einer NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1eGFP Chimäre 4h nach TNF- $\alpha$  Injektion. Farbverlauf von niedrig (schwarz-blau) zu hoher Konzentration (rot-weiß). Gefäße mittels gestrichelter Umrandung markiert. Haarfollikel sind mit „\*“ gekennzeichnet. Maßstab 100µm. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.



**Abbildung 28: Overlap Coefficient von CX<sub>3</sub>CR1 eGFP Zellen und NG2dsRed Zellen nach TNF- $\alpha$  Injektion**



Overlap Coefficient vom grünen (CX<sub>3</sub>CR1eGFP) und roten (NG2DsRed) Signal über eine Stunde, 4,5h nach TNF- $\alpha$  Injektion. Werte auf den Anfangswert normalisiert. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.



**Abbildung 29: Abstand zwischen CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Zellen und NG2<sup>+</sup>Perizyten**

Quantifizierung von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Zellen, die sich nach TNF- $\alpha$  Injektion innerhalb oder außerhalb eines 50 $\mu$ m Radius zu den NG2<sup>+</sup> Perizyten befinden oder mit diesen interagieren. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikanten Unterschied (p<0,05) auf. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

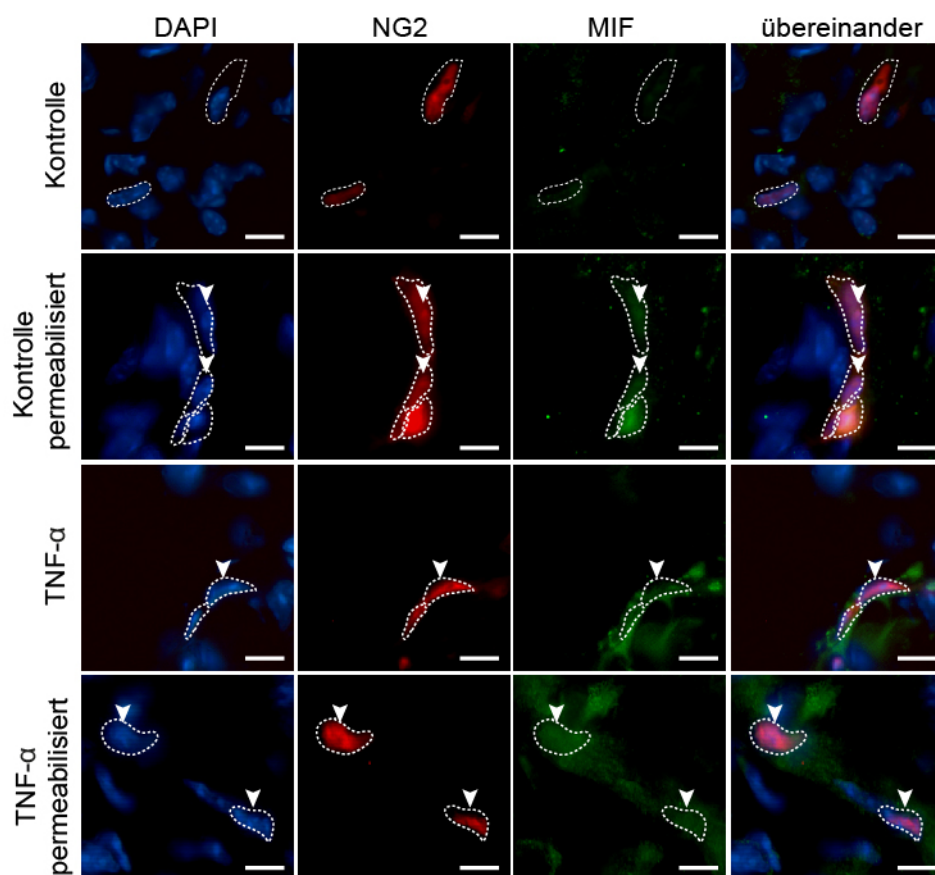
## 5.5 Expression von MIF durch NG2<sup>+</sup> Perizyten

Die Quantifizierungen zeigen, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten auf myeloide Leukozyten chemotaktisch wirken. Da die Untersuchungen bis dato zeigten, dass NG2<sup>+</sup>Perizyten sowohl auf LysM<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten als auch auf CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen chemotaktisch wirken, wurde nach einem Molekül geschaut, dass auf beide Zelltypen wirkt [33, 39]. Dies trifft auf das proinflammatorische MIF zu. Nach der Freisetzung wirkt MIF als ein Hauptregulator des angeborenen Immunsystems und fördert sowohl die interstitielle Migration von Makrophagen als auch von neutrophilen Granulozyten [33, 37, 102]. MIF wird von vielen unterschiedlichen Zellen und Geweben, wie z.B. Endothelzellen, Bindegewebszellen, und Makrophagen synthetisiert, intrazellulär gespeichert und bei Inflammation freigesetzt [31, 33]. Nach Freisetzung fördert es die interstitielle Migration und führt zu einer Hochregulation von TLR4 um Immunzellen für DAMPs zu sensibilisieren [103]. Es handelt sich also um ein sehr vielseitiges und für das angeborene Immunsystem sehr wichtiges Molekül.

Daher wurde mittels Immunhistochemie in der Haut des Ohres einer NG2DsRed Maus untersucht, ob NG2<sup>+</sup> Perizyten MIF speichern und bei einer sterilen Inflammation exprimieren.

Dazu wurde einerseits untersucht, ob MIF in NG2<sup>+</sup> Perizyten MIF physiologisch vorkommt, wofür die Zellen permeabilisiert wurden und im Ohr der Maus wurde vor Entnahme mittels s.c. Injektion von TNF- $\alpha$  eine sterile Inflammation induziert. Außerdem wurden Kontrollexperimente durchgeführt.

In Abbildung 30 zeigt sich, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten physiologisch MIF speichern und bei Stimulation mit TNF- $\alpha$  freisetzen. Daraus folgt, dass bei steriler Inflammation NG2<sup>+</sup> Perizyten das stark chemotaktisch wirksame MIF freisetzen und so auf die myeloiden Leukozyten wirken können.



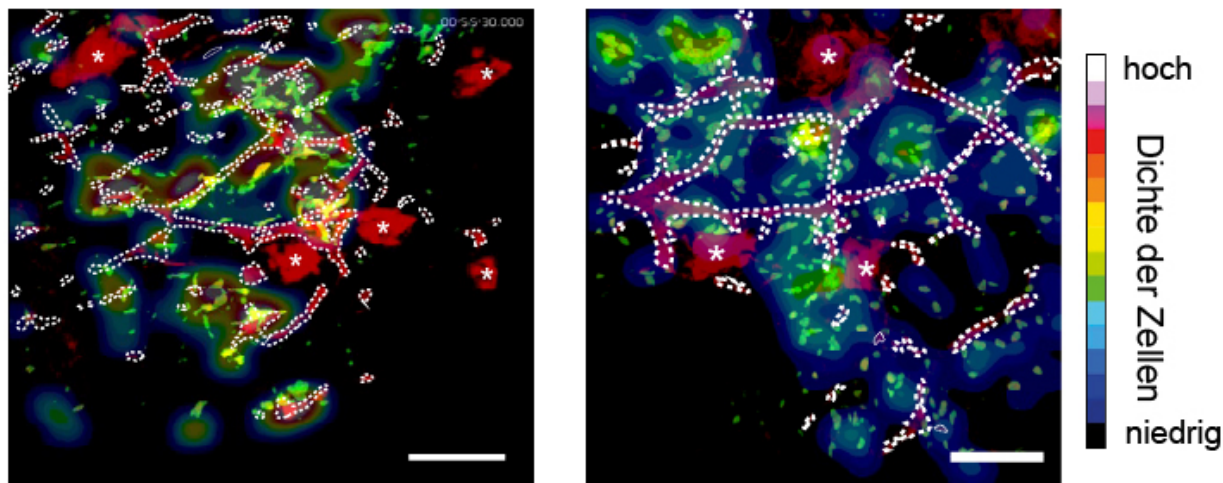
**Abbildung 30: Immunfluoreszenz im Ohr einer NG2DsRed Maus**

Immunfluoreszenz Färbung in der Haut des Ohres einer NG2DsRed Maus 6h nach s.c. Injektion und Stimulation von TNF- $\alpha$  oder NaCl als Kontrolle mit oder ohne Permeabilisierung der NG2<sup>+</sup> Perizyten. Pfeilspitzen kennzeichnen Expression von MIF NG2<sup>+</sup> Perizyten. Gepunktete Linien markieren NG2<sup>+</sup> Perizyten. Maßstab = 25  $\mu$ m. Bilder repräsentativ für n=4 Experimente.

### 5.6 Bedeutung von MIF für chemotaktische Wirkung von NG2<sup>+</sup> Perizyten auf myeloide Leukozyten

Da oben beschriebenen Experimente darauf hinweisen, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten die interstitielle Leukozytenmigration aktiv beeinflussen, wurde zunächst die Expression von Chemokinen durch Perizyten untersucht. Dabei zeigte sich in immunhistologischen Färbungen, dass Perizyten konstitutiv MIF exprimieren und es nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  an ihrer Oberfläche präsentieren. Um zu untersuchen ob MIF für die chemotaktische Wirkung der NG2<sup>+</sup> Perizyten verantwortlich ist, wurde der MIF Inhibitor ISO-1 injiziert.

Zunächst wurde fMLP s.c. in das Ohr von NG2DsRed-LysMeGFP Chimären injiziert, um eine diffuse sterile Inflammation zu induzieren. Anschließend wurde 1,5h nach fMLP Injektion der MIF Inhibitor ISO-1 in das Ohr injiziert, um die interstitielle Migration, aber nicht die Extravasation der myeloiden Leukozyten zu beeinträchtigen. Dann wurden die gleichen Experimente und Analysen durchgeführt wie oben beschrieben.

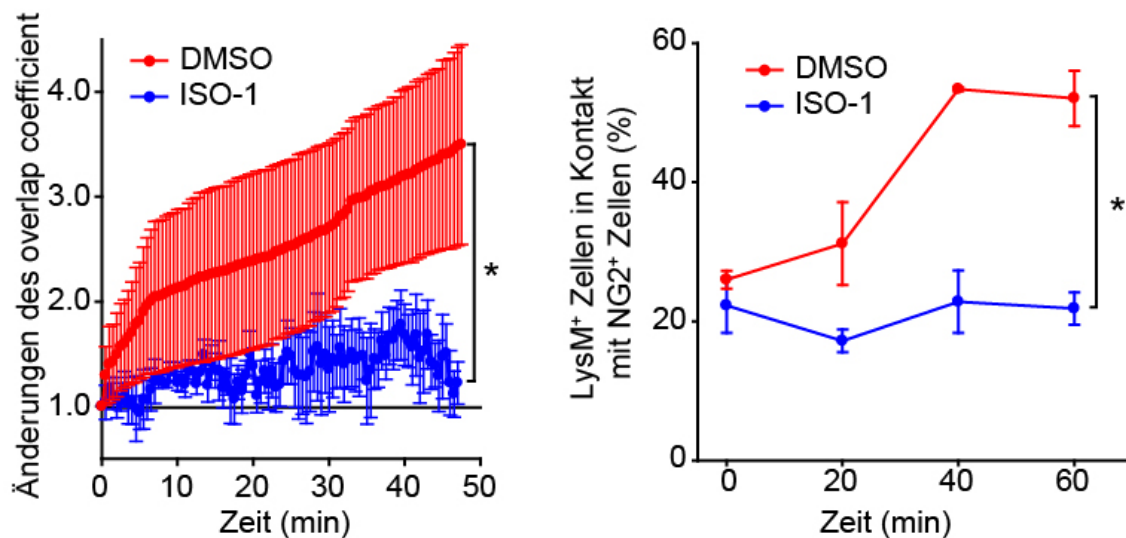


**Abbildung 31: Vergleich der Heatmaps von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation bei Injektion von ISO-1**

Darstellung der Verteilung von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten mittels Heatmap, (links) 2h55min nach fMLP Injektion. (Rechts) 3h nach fMLP Injektion und 1.5h nach ISO-1 Injektion. In NG2DsRed-LysMeGFP Chimären. Farbverlauf von niedriger (schwarz-blau) zu hoher Dichte (rot-weiß). Gefäße mittels gestrichelter Umrandung markiert. Haarfollikel sind mit „\*“ gekennzeichnet. Maßstab 100µm. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

Nach Inhibition von MIF durch ISO-1 zeigt sich eine wesentlich zufälligeren Verteilung der LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Wo in der Kontrolle eine deutliche Akkumulation der myeloiden Leukozyten um die NG2<sup>+</sup> Perizyten zu sehen war, zeigt sich dies nach ISO-1 Injektion nicht mehr. Deutlich erkennbar ist die zufällige Verteilung an den flächigen blauen Arealen in der Heatmap.

Die Colocalization der LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten und der NG2<sup>+</sup> Perizyten wurde mittels Overlap Coefficient nach s.c. Injektion von fMLP und ISO-1 bzw. fMLP und DMSO als Kontrolle bestimmt. Außerdem wurden die Kontakte zwischen LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten und NG2<sup>+</sup> Perizyten nach Injektion von fMLP und ISO-1 bzw. fMLP und DMSO als Kontrolle quantifiziert.



**Abbildung 32: Overlap Coefficient und Kontakte von LysM<sup>+</sup> Zellen mit NG2<sup>+</sup> Zellen nach ISO-1 Injektion.**

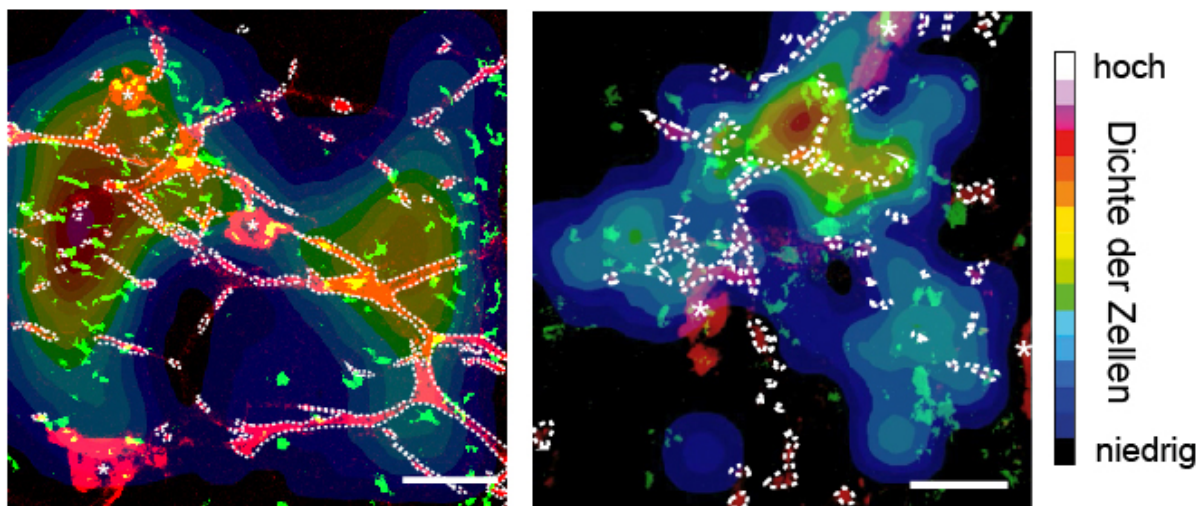
Overlap Coefficient vom grünen (LysMeGFP) und roten (DsRed) Signal über eine Stunde, 2h nach fMLP und 30 min nach Injektion von ISO-1 oder DMSO als Kontrolle. Werte auf den Anfangswert normalisiert. (Rechts) Quantifizierung von LysM<sup>+</sup> Zellen, die in Kontakt mit NG2<sup>+</sup> Zellen stehen über den Zeitraum von einer Stunde nach Injektion von ISO-1 oder DMSO als Kontrolle. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.

Der Overlap Coefficient zeigt, dass durch die Blockierung von MIF mittels ISO-1 Injektion die perivaskuläre Akkumulation von LysM<sup>+</sup> Zellen gestoppt wird und sich signifikant von der Kontrolle mit DMSO Injektion unterscheidet. Die Anzahl der Kontakte zwischen LysM<sup>+</sup> Zellen und NG2<sup>+</sup> Zellen ist signifikant niedriger bei ISO-1 Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Resultat der DMSO Kontrolle unterscheidet sich nicht von der alleinigen

Injektion von fMLP in Abbildung 25, wo es zu einer Zunahme der  $\text{LysM}^+$  Zellen an den Gefäßen kommt.

Anschließend wurden die gleichen Experimente und Untersuchungen mit bei NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1eGFP Chimären durchgeführt, um zu überprüfen ob ISO-1 die chemotaktische Wirkung von NG2<sup>+</sup> Perizyten auf CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen ebenfalls hemmt.

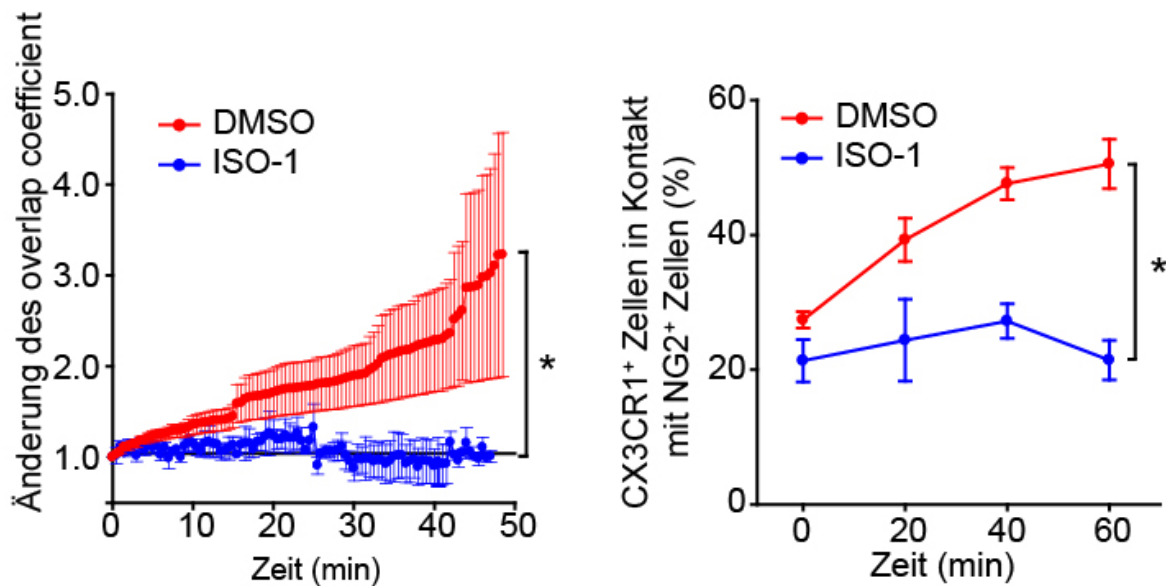
Dazu wurde NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1eGFP Chimären 3.5h nach TNF- $\alpha$  Injektion ISO s.c. in das Ohr injiziert und die Verteilung der CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen mittels Heatmap, Overlap Coefficient und Bestimmung der Kontakte zwischen CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen und NG2<sup>+</sup> Perizyten analysiert.



**Abbildung 33: Vergleich der Heatmaps von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen bei steriler Inflammation bei Injektion von ISO-1**

(Links) Darstellung der Verteilung von CX<sub>3</sub>CR1eGFP Makrophagen mittels Heatmap in einer NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1eGFP Chimäre 6h 15min nach TNF- $\alpha$  Injektion. (Rechts) Darstellung der Verteilung von CX<sub>3</sub>CR1eGFP Makrophagen mittels Heatmap in einer NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1eGFP Chimäre 6h nach TNF- $\alpha$  Injektion und 2.5h nach ISO-1 Injektion. Beide Darstellungen: Farbverlauf von niedriger (schwarz-blau) zu hoher Dichte (rot-weiß). Gefäße mittels gestrichelter Umrandung markiert. Haarfollikel sind mit „\*“ gekennzeichnet. Maßstab 100 $\mu\text{m}$ . Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.





**Abbildung 34: Overlap Coefficient und Kontakte von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Zellen mit NG2<sup>+</sup> Zellen nach ISO-1 Injektion.**

(Links) Overlap Coefficient des grünen (eGFP) und roten (DsRed) Signals über eine Stunde, 4.5 nach fMLP und 30 min nach Injektion von ISO-1 oder DMSO als Kontrolle. Werte auf den Anfangswert normalisiert. (Rechts) Quantifizierung von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Zellen, die in Kontakt mit NG2<sup>+</sup> Zellen stehen über den Zeitraum von einer Stunde nach Injektion von ISO-1 oder DMSO als Kontrolle. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikante Unterschied ( $p < 0,05$ ) auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.

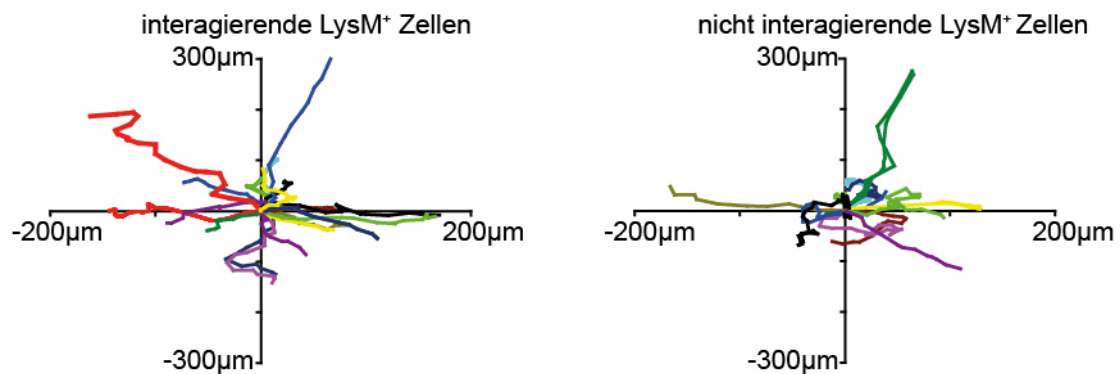
Die Experimente zeigen, dass durch die Inhibierung von MIF durch ISO-1 die Akkumulation von myeloiden Leukozyten an NG2<sup>+</sup> Perizyten und im perivaskulären Kompartiment massiv gestört wird. Dies ist sowohl anhand des Overlap Coefficients und der Bestimmung der Kontakte zwischen NG2<sup>+</sup> Perizyten und myeloiden Leukozyten zu deutlich sehen (siehe Abbildung 32 und Abbildung 34). Die Verteilung in der myeloiden Leukozyten in den Heatmaps (Abbildung 31 und Abbildung 33) erscheint nun zufälliger und in keinem Zusammenhang mit den NG2<sup>+</sup> Perizyten zu stehen. Zusammenfassend kann durch diese Experimente in vivo gezeigt werden, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten myeloide Leukozyten aktiv in den perivaskulären Raum rekrutieren, was durch den chemotaktischen Botenstoff MIF vermittelt wird.

### 5.7 Aktivierung myeloider Leukozyten durch Perizyten bei interstitieller Migration *in vivo*

Nachdem gezeigt worden ist, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten die interstitielle Migration beeinflussen indem sie chemotaktisch auf die myeloiden Leukozyten wirken, wurde in den folgenden

Experimenten untersucht welchen Einfluss die Interaktion zwischen NG2<sup>+</sup> Perizyten und myeloide Leukozyten auf deren Migrationsmuster hat und ob diese Interaktion den myeloiden Leukozyten einen Vorteil bietet.

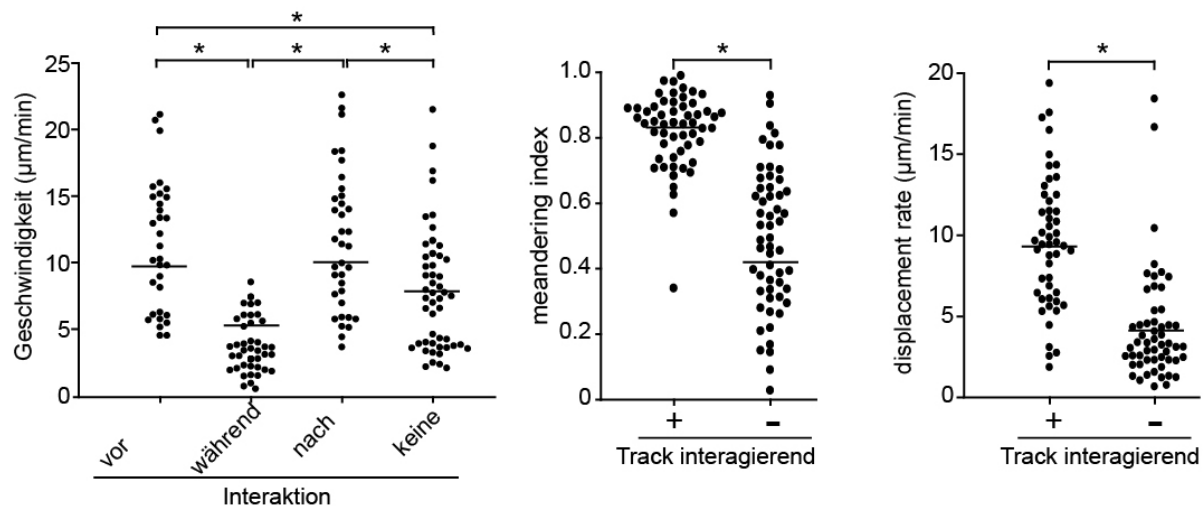
Um dies zu untersuchen wurden NG2DsRed-eGFP Chimären s.c. fMLP in das Ohr injiziert und die Migrationsparameter von interagierenden und nicht interagierenden Leukozyten verglichen,



**Abbildung 35: Trackplot von LysM<sup>+</sup> Zellen bei steriler Inflammation**

Trackplot von LysM<sup>+</sup> Zellen nach fMLP Injektion. (Links) die Migrationspfade der interagierenden LysM<sup>+</sup> Zellen. (Rechts) die Migrationspfade der nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> Zellen. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

In Abbildung 35 ist deutlich zu sehen, dass sich schon rein optisch die interagierend und nicht interagierenden Zellen unterscheiden, da die Tracks interagierender LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten wesentlich gradliniger sind. Im Gegensatz dazu sind die Tracks nicht interagierenden Zellen wesentlich kürzer und ungerichteter.



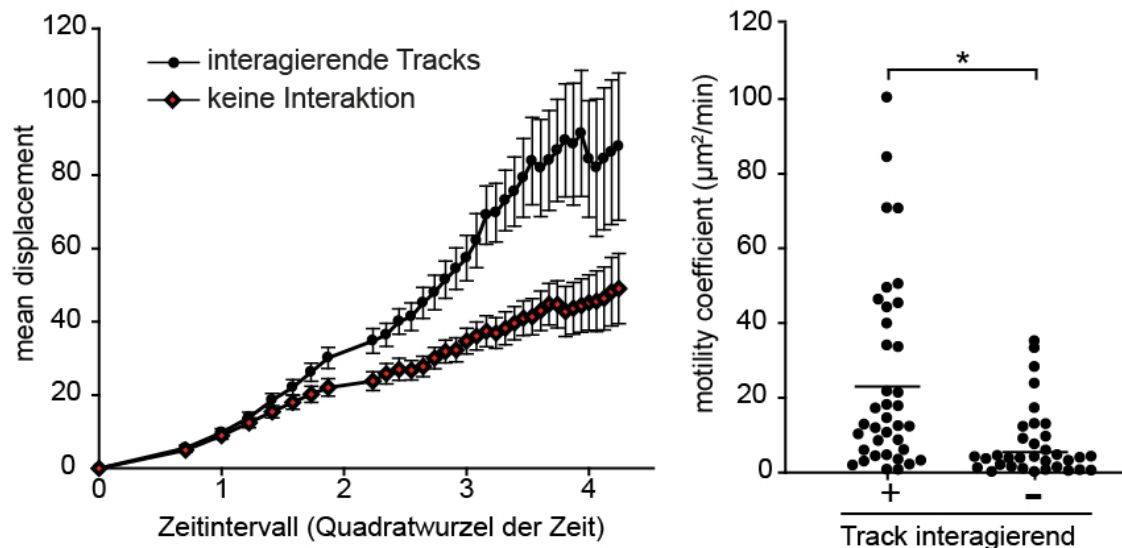
**Abbildung 36: Migrationsprofile von  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation**

(Links) Geschwindigkeit von einzelnen  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten vor, während und nach Interaktion mit  $\text{NG2}^+$  Perizyten. Geschwindigkeit von  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten ohne Interaktion. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Mitte) Meandering Index von einzelnen interagierenden und nicht mit  $\text{NG2}^+$  Perizyten interagierenden  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Rechts) Displacement Rate von einzelnen interagierenden und nicht mit  $\text{NG2}^+$  Perizyten interagierenden  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.

Anschließend wurde das interstitielle Migrationsverhalten der myeloiden Leukozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit  $\text{NG2}^+$  Perizyten genauer charakterisiert.

In Abbildung 36 ist zu erkennen, dass die interagierenden  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten einen deutlichen Vorteil haben. Sie migrieren vor und nach Interaktion signifikant schneller als die nicht interagierenden  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten. Die interagierenden Zellen haben nicht nur einen Vorteil hinsichtlich der Geschwindigkeit, sondern auch was die Geradlinigkeit ihrer Migrationspfade betrifft. Ihr Meandering Index ist signifikant höher als der der nicht interagierenden Zellen. Gleiches gilt für ihre Displacement Rate die ebenfalls signifikant größer ist. Die Interagierenden Zellen migrieren also nicht nur schneller sondern auch gezielter durch das Gewebe im Vergleich zu Immunzellen, die nicht mit  $\text{NG2}^+$  Perizyten in Kontakt treten.



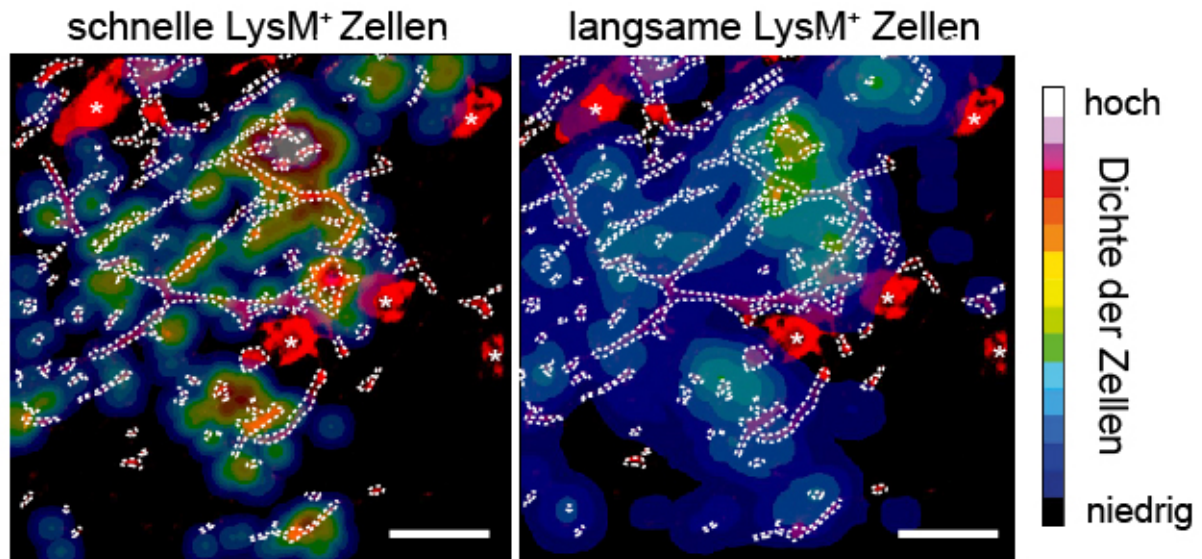


**Abbildung 37: Mean Displacement Plot und Motility Coefficient von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation**

(Links) Mean Displacement Plot von Tracks mit einer Dauer von über 10min von interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. (Rechts) Motility Coefficient von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen eine signifikante Erhöhung ( $p < 0,05$ ) auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.

In Abbildung 37 weisen beiden Gruppen im Mean Displacement Plot eine lineare Steigung auf, was für eine zufällige Migration spricht. Da es bei fMLP Injektion zu einer diffusen sterilen Inflammation in der Haut des Ohrs kommt und somit kein Chemokingradient im Gewebe vorliegt, war dieses Ergebnis zu erwarten.

Interessanterweise zeigte die Analyse des motility coefficient, dass sich die unterschiedlichen Migrationsparameter der interagierenden und nicht interagierenden myeloiden Leukozyten deutliche Unterscheiden hinsichtlich ihrer Fähigkeit Gewebeareale abzusuchen. In Abbildung 377 wird deutlich, dass die interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten einen signifikant höheren Motility Coefficient (Mittelwert  $27 \mu\text{m}^2/\text{min}$ ) haben und somit ein wesentlich größeres Areal nach Entzündungsprozessen scannen können als die nicht interagierenden neutrophilen Granulozyten (Mittelwert  $8 \mu\text{m}^2/\text{min}$ ).



**Abbildung 38: Heatmaps von schnell und langsam migrierenden LysM<sup>+</sup> Zellen bei steriler Inflammation**

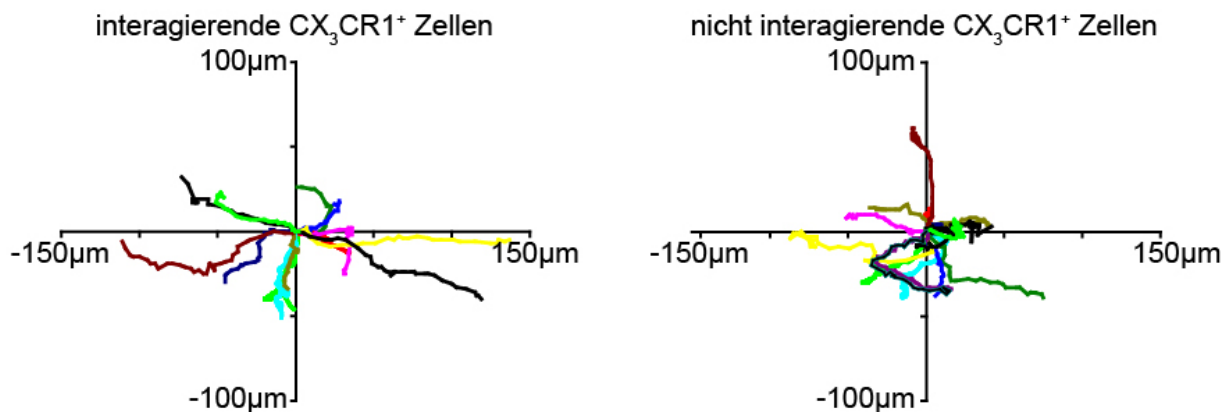
Heatmaps von der Verteilung schnell und langsam migrierender LysM<sup>+</sup> Zellen. Die Geschwindigkeit wurde mittels automatischem Tracking bestimmt. Links sind die schnellsten 25%, Rechts die langsamsten 25% der LysM<sup>+</sup> Zellen dargestellt. Haarfollikel sind mit „\*“ gekennzeichnet. Maßstab = 100µm. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

In Übereinstimmung mit den oben gezeigten Daten aus der Einzelzellanalyse zeigt die Heatmap in Abbildung 38, die nach schnell und langsam migrierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulocyten unterteilt ist, dass die schnell migrierenden Zellen vor allem perivaskulär um NG2<sup>+</sup> Perizyten migrieren, wohingegen die langsamen LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulocyten eher diffus, zufällig im Gewebe verteilt sind.

Nachdem gezeigt wurde, dass LysM<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten von der Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten profitieren, wurde untersucht, ob die CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen ebenfalls einen Vorteil von der Interaktion haben. Dazu wurde einer NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1eGFP Chimäre s.c. TNF-α in das Ohr injiziert um eine diffuse sterile Inflammation zu erzeugen und anschließend im 2-Photonen-Mikroskop visualisiert. Wie auch die LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten profitieren die CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen von der Interaktion mit den NG2<sup>+</sup>Perizyten.

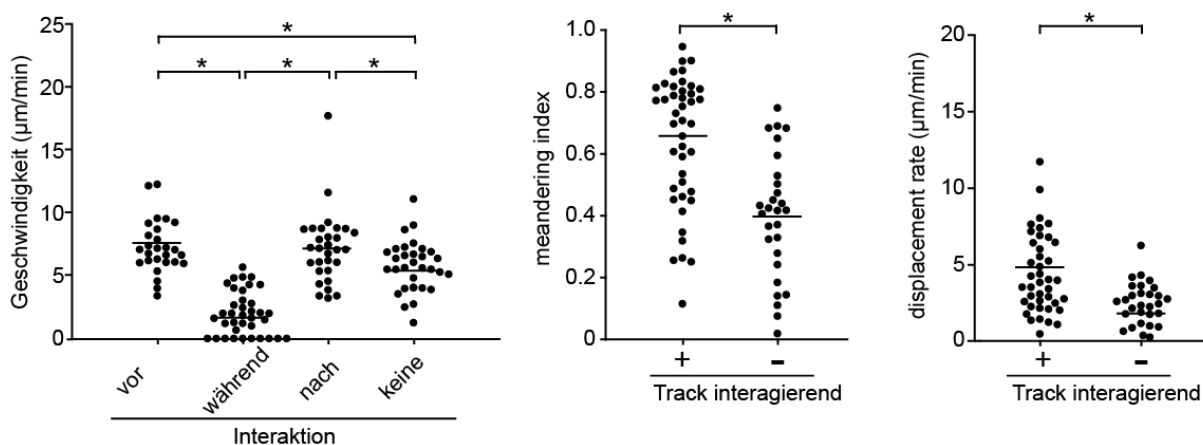
Die interagierenden myeloiden Leukozyten sind signifikant schneller als die nicht interagierenden. Außerdem wurde mit den Heatmaps ( Abbildung 38 und Abbildung 42 ) gezeigt, dass die schnell migrierenden myeloiden Leukozyten sich im perivaskulären Kompartiment aufhalten und dort entlang der Perizyten durchs Interstitium migrieren. Da die

interagierenden myeloiden Leukozyten eine höhere Migrationsgeschwindigkeit haben und eine höhere Direktionalität (Abbildung 36 und Abbildung 37) aufweisen, haben sie folglich auch einen signifikant höheren Motility Coefficient (Abbildung 40 und Abbildung 41). Dies bedeutet, dass die interagierenden myeloiden Leukozyten im Stande sind ein größerer Areal im Interstitium zu scannen und so einen Vorteil haben hinsichtlich der Immunabwehr.



**Abbildung 39: Trackplot CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Zellen bei steriler Inflammation**

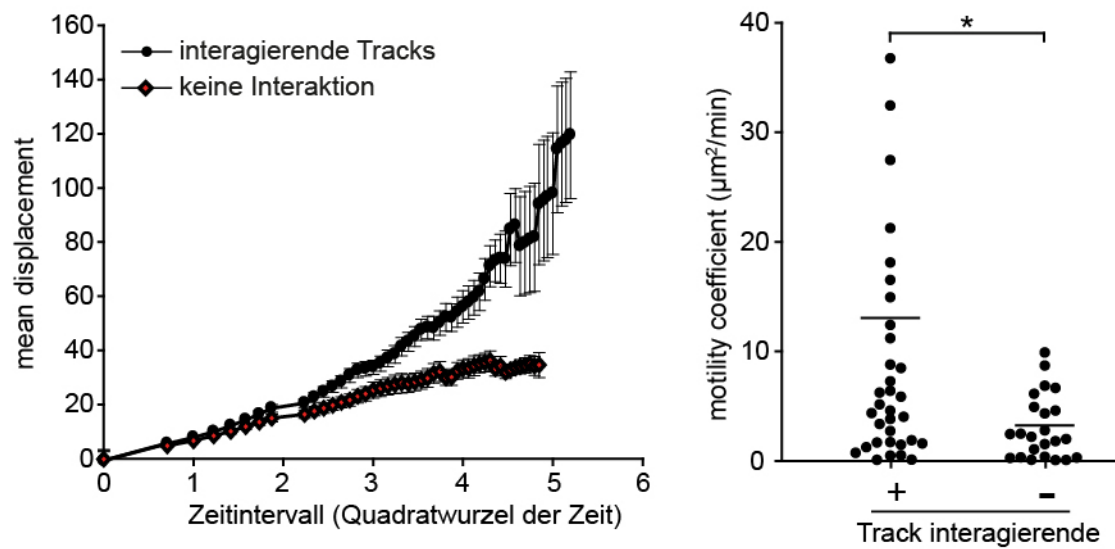
Trackplot von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Zellen nach TNF- $\alpha$  Injektion: (Rechts) Migrationspfade der mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Zellen; (Links) Migrationspfade der nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Zellen. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.



**Abbildung 40: Migrationsprofile von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen bei steriler Inflammation**

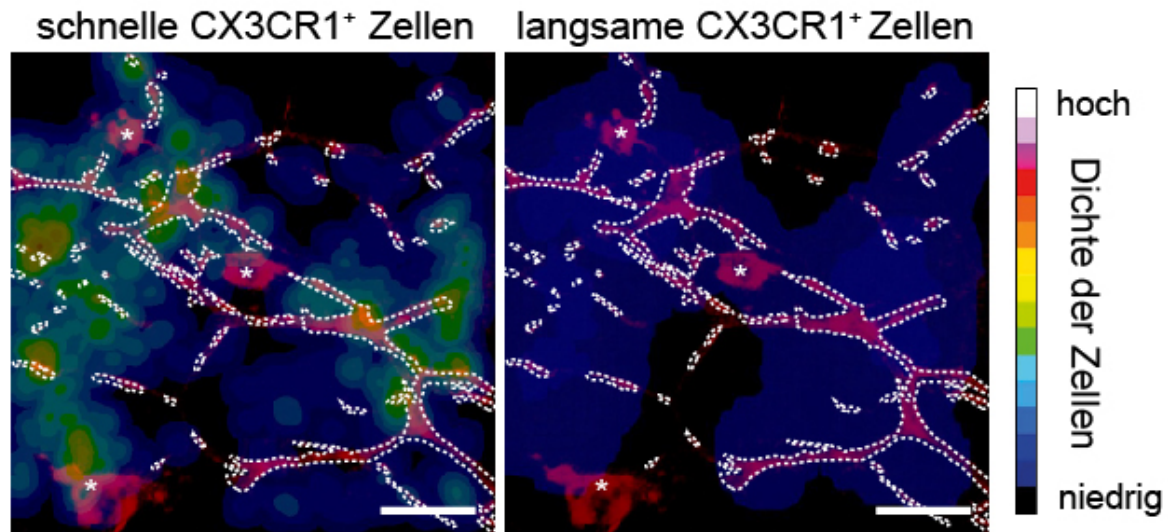
(Links) Geschwindigkeit von einzelnen CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen vor, während und nach Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten. Geschwindigkeit von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen ohne Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Mitte) Meandering Index von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Links) Displacement Rate von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. Horizontale Linie markiert den Mittelwert.

Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.



**Abbildung 41: Mean Displacement Plot und Motility Coefficient von  $\text{CX}_3\text{CR1}^+$  Makrophagen bei steriler Inflammation**

(Links) Mean Displacement Plot von Tracks mit Dauer von über 10min von interagierenden und nicht mit  $\text{NG2}^+$  Perizyten interagierenden  $\text{CX}_3\text{CR1}^+$  Makrophagen. (Rechts) Motility Coefficient von einzelnen interagierenden und nicht mit  $\text{NG2}^+$  Perizyten interagierenden  $\text{CX}_3\text{CR1}^+$  Makrophagen. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.



**Abbildung 42: Heatmaps von schnell und langsam migrierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen bei steriler Inflammation**

Heatmap der Dichte (rot-weiß: hohe Dichte; blau-schwarz: niedrige Dichte) schnell und langsam migrierender CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. Die Geschwindigkeit wurde mit Hilfe des automatischen Trackings bestimmt: (links) die schnellsten 25% CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen, (rechts) die langsamsten 25% der CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. Haarfollikel sind mit „\*“ gekennzeichnet. Maßstab = 100µm. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

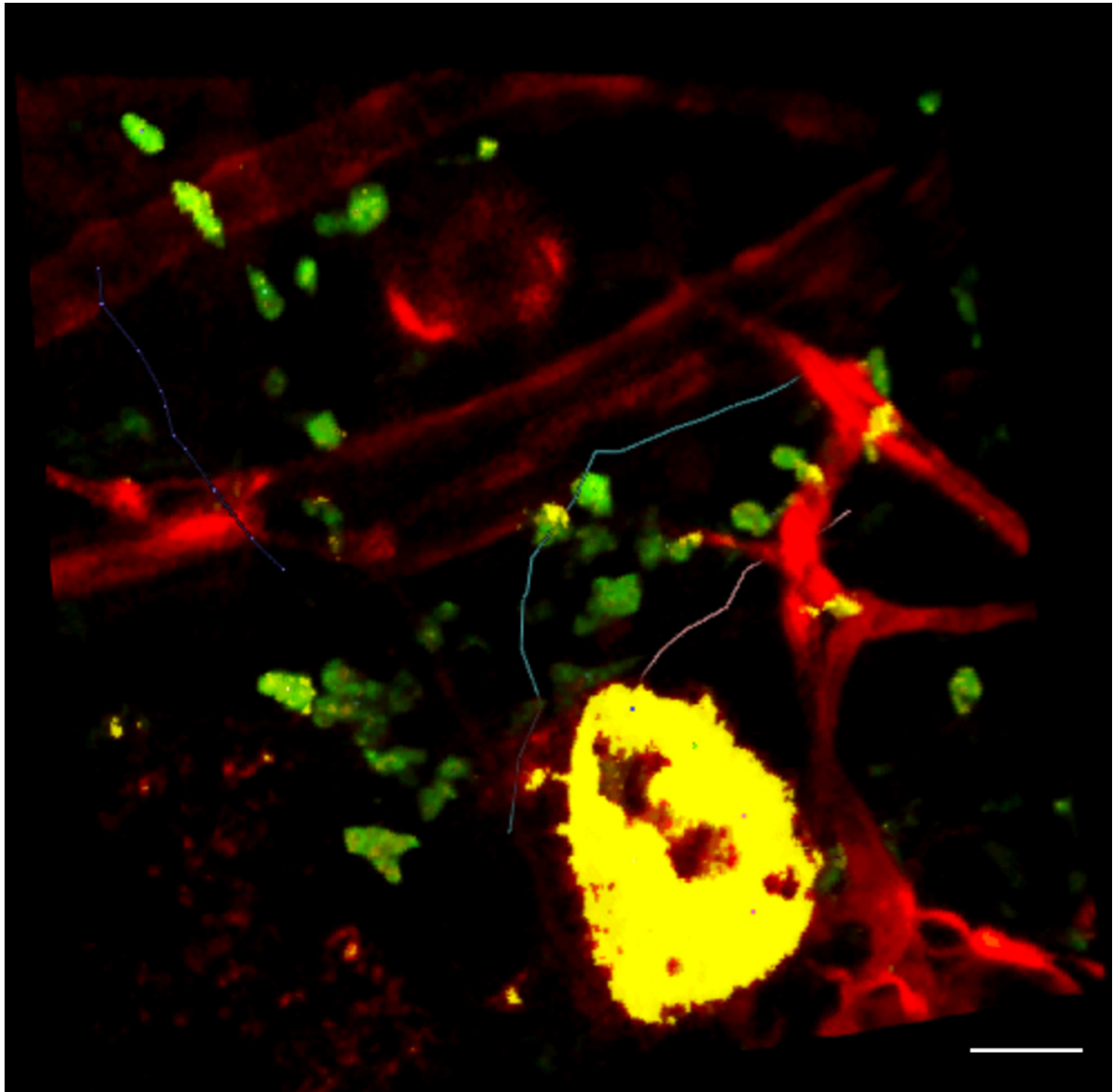
## 5.8 Bedeutung von NG2<sup>+</sup> Perizyten für das interstitielle Migrationsmuster myeloider Leukozyten

Als nächstes wurde untersucht ob die mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten einen Vorteil haben bei der zielgerichteten Migration zu einer fokalen sterilen Inflammation. Um dies zu untersuchen wurde *in vivo* im Ohr der NG2DsRed-LysMeGFP Chimäre mittels des Laserverletzungs-Modells eine fokale sterile Inflammation erzeugt. Aufgrund des fokalen Gewebeschadens entsteht so ein DAMP Gradient im Gewebe. Dies ist ein deutlicher Unterschied zur Injektion von fMLP im Ohr der Chimäre, wo auf Grund mehrerer Injektionsstellen kein Gradient erzeugt wird.

Zunächst wurde untersucht, ob es auch bei zielgerichteter Migration zu einem Nekrosefokus zu adhäsiven Interaktionen zwischen LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten und NG2<sup>+</sup> Perizyten kommt. Tatsächlich waren auch hier Interaktionen visualisierbar, wobei auch hierbei eine verminderte Migrationsgeschwindigkeit während der Interaktion feststellbar war. Auffällig ist auch die Interaktionsdauer: zusätzlich zu den kurzen Interaktionen gab es bei der diffusen

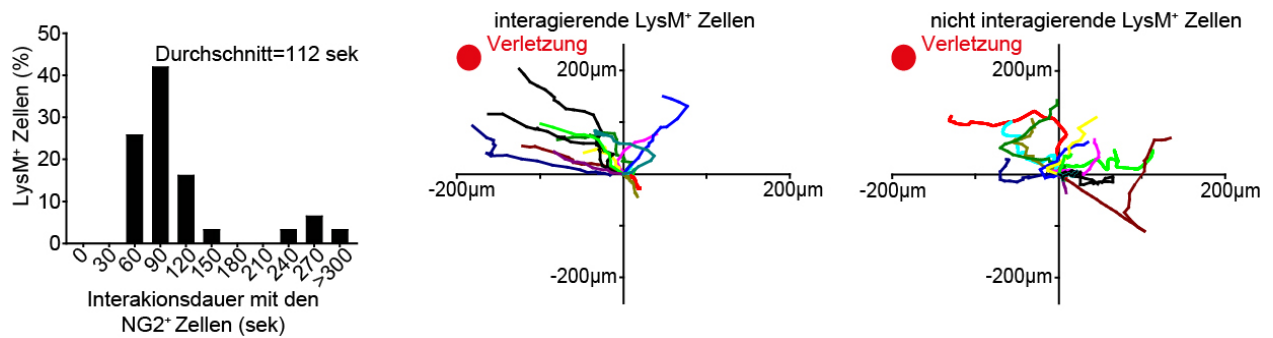
sterilen Inflammation noch eine Gruppe von langen Interaktionen. Im Gegensatz dazu waren bei einer fokalen sterilen Inflammation fast nur kurze dynamische Interaktionen detektierbar. Auch hier wurde wieder untersucht, ob der Kontakt mit NG2<sup>+</sup> Perizyten das Muster der interstitiellen Leukozytenmigration beeinflusst. Dafür wurden interagierende LysM<sup>+</sup> Zellen mit solchen Verglichen, die während des Beobachtungszeitraums keine Interaktion aufweisen. Bereits In den Trackplots (Abbildung 44) sind deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen zu erkennen. Während die mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten gezielt und in einem sehr direkten Weg zu der Gewebsnekrose migrieren, nehmen die nicht interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten einen scheinbar eher zufällig Weg durch das Gewebe.





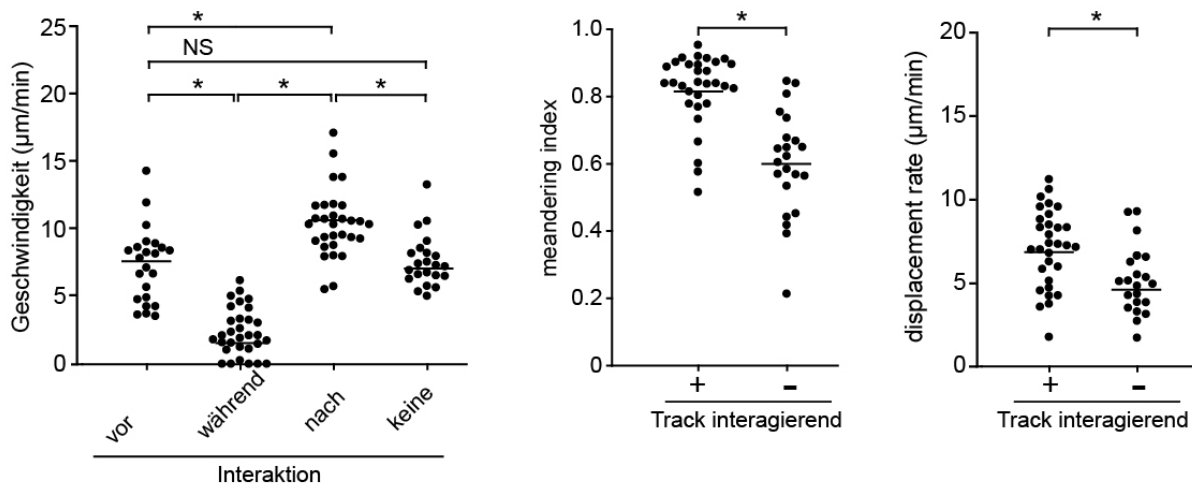
**Abbildung 43: Laser Injury LysM<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten**

2-Photonen Mikroskopie von NG2<sup>+</sup> Perizyten(rot) die LysM<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten (grün) zur sterilen Inflammation geleitet werden. 45 min nach Laserverletzung (gelb) bei einer NG2DsRed-LysMeGFP Chimäre. Linien markieren einzelne Migrationspfade von LysM<sup>+</sup> neutrophiler Granulozyten. Maßstab 50µm. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.



**Abbildung 44: Interaktionsdauer und Track Plots von LysM<sup>+</sup> Zellen bei Laserverletzung**

(Links) Verteilung der Interaktionszeiten von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten mit NG2<sup>+</sup> Perizyten nach Laserverletzung. Trackplot von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten nach Laserverletzung: (Mitte) die Migrationspfade der mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten; (Rechts) die Migrationspfade der nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten nach Laserverletzung. Roter Punkt markiert die Laserverletzung. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.



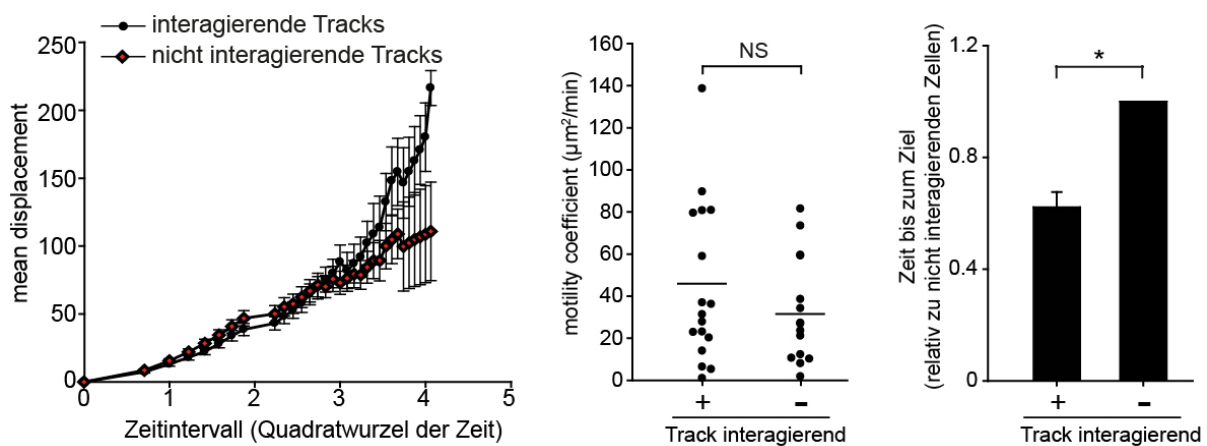
**Abbildung 45: Migrationsprofile von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bei Laserverletzung**

(Links) Geschwindigkeit von einzelnen LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten vor, während und nach Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten. Geschwindigkeit von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten ohne Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Mitte) Meandering Index von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Rechts) Displacement Rate von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikanten Unterschied (p<0,05) auf. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.



Zudem sind die interagierenden  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten vor Interaktion mit den  $\text{NG2}^+$  Perizyten ungefähr genauso schnell wie die nicht interagierenden  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten. Nach Interaktion sind sie jedoch signifikant schneller als vor Interaktion. Dies spricht für eine Aktivierung der  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten durch die  $\text{NG2}^+$  Perizyten. Nach der Bestimmung der Geschwindigkeit der  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten wurde ihre Direktionalität und ihre Fähigkeit zum Nekrosefokus zu navigieren untersucht.

Was in den Track Plots (Abbildung 44) schon zu sehen war, wurde mit Hilfe des Meandering Index und der Displacement Rate (Abbildung 45) zusätzlich noch quantifiziert. Die interagierenden  $\text{LysM}^+$  neutrophile Granulozyten migrieren wesentlich effizienter und direkter zu ihrem Ziel - der Gewebsnekrose.



**Abbildung 46: Mean Displacement Plot, Motility Coefficient sowie die Dauer bis zum Erreichen der Laserverletzung von  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten.**

(Links) Mean Displacement Plot von Tracks mit Dauer von über 10min von interagierenden und nicht mit  $\text{NG2}^+$  Perizyten interagierenden  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten. (Mitte) Motility Coefficient von einzelnen interagierenden und nicht mit  $\text{NG2}^+$  Perizyten interagierenden  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert (Rechts) Dauer der Migration von  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten zur Laserverletzung. Alle Zellen hatten den gleichen Abstand zur Laserverletzung. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikante Unterschied ( $p < 0,05$ ) auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.

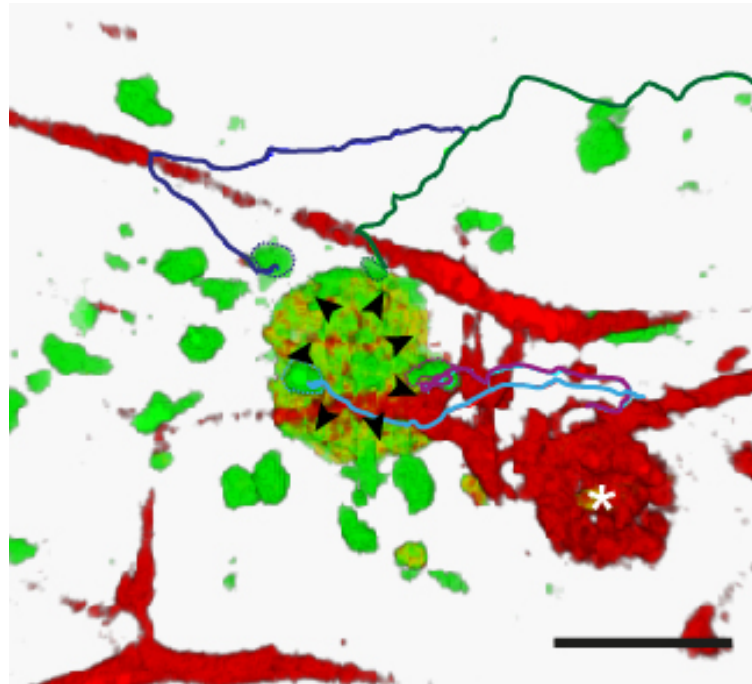
Im Mean Displacement Plot (Abbildung 46) zeigt sich bei nicht interagierenden  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten ein linearer Anstieg, was für eine zufällige Migration spricht. Die Kurve der interagierenden  $\text{LysM}^+$  neutrophilen Granulozyten hat keine lineare Steigung mit deutlicher Zunahme der Steigung über den Zeitverlauf, was auf eine gezielte Migration durch

das interstitielle Gewebe hindeutet. Hinsichtlich des Motility Coefficients zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Zellpopulationen.

Außerdem wurde analysiert, ob die unterschiedlichen Migrationsparameter zwischen den interagierenden und nicht-interagierenden LysM<sup>+</sup> Zellen zu einer höheren Effizienz hinsichtlich der Navigation zu einem Nekrosefokus führen. Dafür wurde die Zeit verglichen, die Zellen benötigen um am Nekrosefokus anzugelangen, wenn sie in derselben Distanz starten. Dabei zeigte sich, dass die interagierenden Leukozyten den Vorteil haben, dass sie den Entzündungsherd schneller erreichen als Zellen, die nicht mit den NG2<sup>+</sup> Perizyten interagieren.

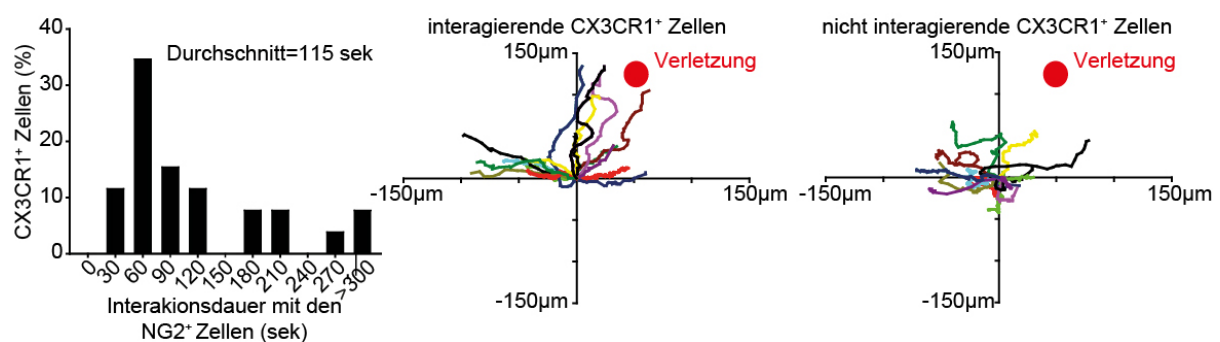
Desweiteren wurde an NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1eGFP Chimäre untersucht ob die Interaktion von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen mit NG2<sup>+</sup> Perizyten den Makrophagen einen ähnlichen Vorteil bietet wie den LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Dazu wurden wie bei den LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten in NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1eGFP Chimären mit Hilfe des Laserverletzung-Modells eine Gewebsnekrose im Ohr erzeugt. Wie auch die LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten weisen die CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen signifikante Vorteile durch Interaktion auf. Die interagierenden myeloiden Leukozyten sind nach Interaktion signifikant schneller als die nicht interagierenden myeloiden Leukozyten.

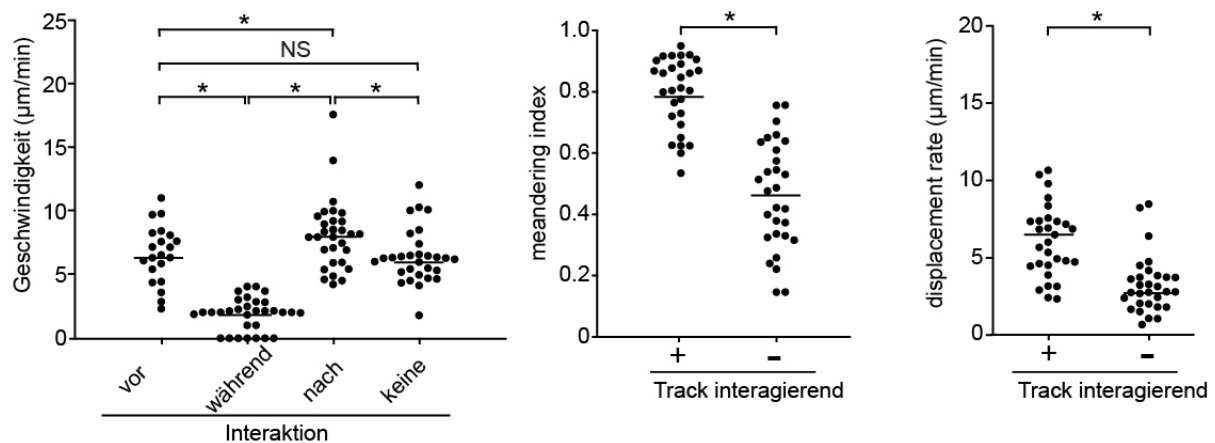
Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass die interagierenden myeloiden Leukozyten wesentlich effektiver durch das Gewebe migrieren. Deutlich wird dies durch den signifikant höheren Meandering Index und die höhere Displacement Rate (siehe Abbildung 45 und Abbildung 49). Auch migrieren die interagierenden myeloiden Leukozyten zielorientiert wohingegen die nicht interagierenden zufälliger im Gewebe migrieren (siehe MDP Abbildung 46 und Abbildung 50). Aus diesen Vorteilen resultiert, dass die interagierenden myeloiden Leukozyten wesentlich schneller die fokale sterile Inflammation erreichen. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die myeloiden Leukozyten von den NG2<sup>+</sup> Perizyten aktiviert werden und so effektiver migrieren können.



**Abbildung 47: Laser Injury CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen**

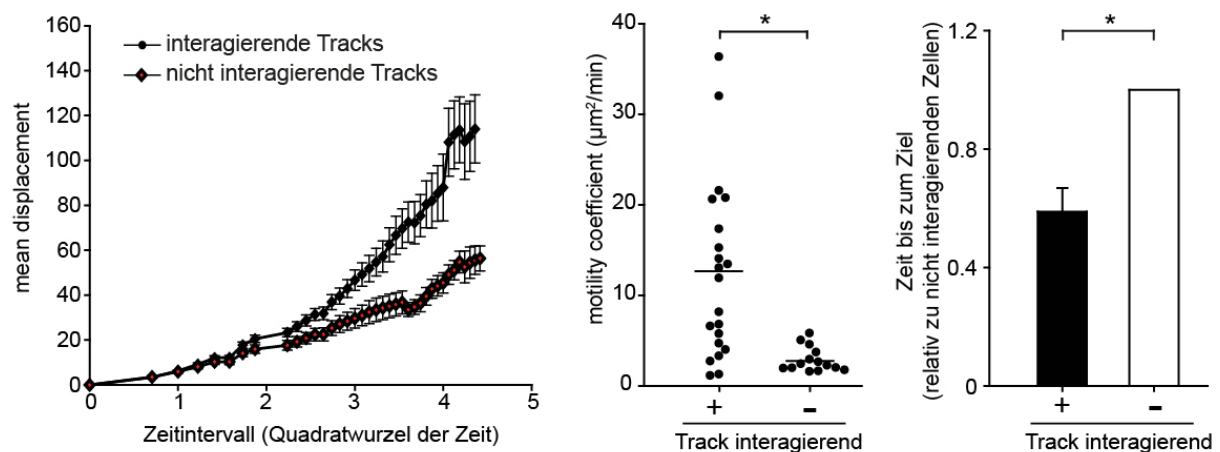
2-Photonen Mikroskopie von NG2<sup>+</sup> Perizyten (rot) die CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen (grün) zur sterilen Inflammation leiten. 45 min nach Laserverletzung (gelb, durch Pfeile markiert) bei einer NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1GFP Chimäre. Maßstab 50µm. Haarfollikel sind mit „\*“ gekennzeichnet. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.





**Abbildung 49: Migrationsprofile von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen bei Laserverletzung**

(Links) Geschwindigkeit von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen vor, während und nach Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten. Geschwindigkeit von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen ohne Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Mitte) Meandering Index von einzelnen interagierenden und nicht NG2<sup>+</sup> Perizyten. interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Rechts) Displacement Rate von einzelnen interagierenden und nicht NG2<sup>+</sup> Perizyten. interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.



**Abbildung 50: Mean Displacement Plot, Motility Coefficient sowie die Dauer bis zum Erreichen der Laserverletzung von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen**

(Links) Mean Displacement Plot von Tracks mit Dauer von über 10min von interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. (Mitte) Motility Coefficient von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Rechts) Dauer der Migration von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen zur Laserverletzung. Alle Zellen hatten den gleichen Abstand zur Laserverletzung. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.

### 5.9 NG2<sup>+</sup> Perizyten leiten myeloide Leukozyten mittels MIF

Nach dem gezeigt wurde, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten myeloide Leukozyten bei steriler Inflammation aktivieren, wurde daraufhin untersucht ob diese Aktivierung bei diffuser steriler Inflammation MIF abhängig ist. Das Molekül MIF sollte in diesem Zusammenhang genauer untersucht werden, da die vorherigen Immunhistochemischen Untersuchungen(5.5.) zeigten, dass bei steriler Inflammation NG2<sup>+</sup>Perizyten MIF exprimieren. Außerdem wurde in den zuvorigen Experimenten(5.6) gezeigt, dass durch die Inhibierung von MIF durch ISO-1 es zu reduzierten Interaktionen und einer geringen Akkumulation um die NG2<sup>+</sup>Perizyten kam, also die chemotaktische Wirkung der NG2<sup>+</sup>Perizyten auf die myeloiden Leukozyten herabgesetzt werden. MIF ist ein Hauptregulator des angeborenen Immunsystems bei Inflammation und wirkt sehr stark auf neutrophile Granulozyten und Makrophagen.[33, 102]. Daher sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, wie sich die Inhibierung von MIF auf die interstitielle Migration und ihrer Parameter auswirkt.

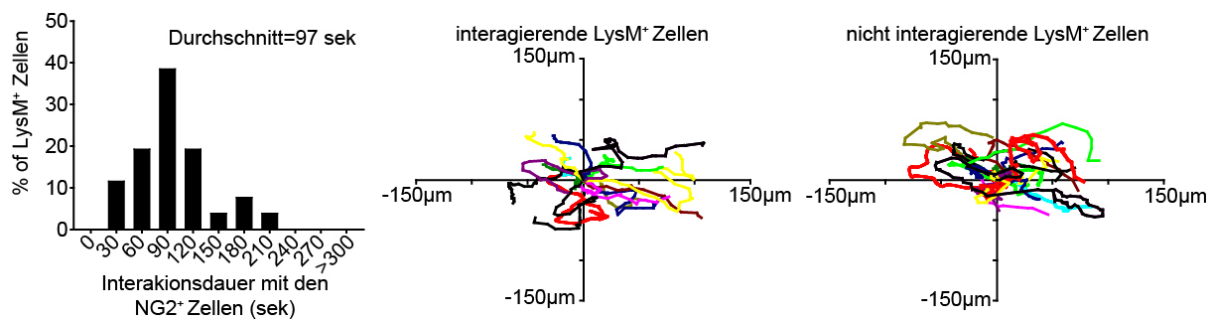
Zunächst wurden die LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten untersucht. Dazu wurde einer NG2DsRed-LysMeGFP Chimäre s.c. fMLP in das Ohr injiziert um eine diffuse sterile Inflammation zu induzieren. Anschließend wurde nach 1.5h nach fMLP-Injektion, der MIF-Antagonist ISO-1 s.c. in das Ohr injiziert um MIF zu inhibieren. Daraufhin wurden wie schon bei den vorherigen Experimenten die Migration der LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten untersucht.

Dabei fiel zunächst auf, dass nach ISO-1 Injektion die langen Interaktionen über 5 Minuten komplett wegfallen, wobei die kurzen weiterhin bestehen (Abbildung 51 ).

Zudem sind nach Inhibition von MIF keine Unterschiede in den Trackplots (Abbildung 51) zwischen den mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden und nicht interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten feststellbar. Beiden Trackplots scheint eine zufällige Migration der LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten zu Grunde zu liegen. Die Tracks der interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten entsprechen denen der nicht interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bei alleiniger Injektion von fMLP (siehe Abbildung 35).

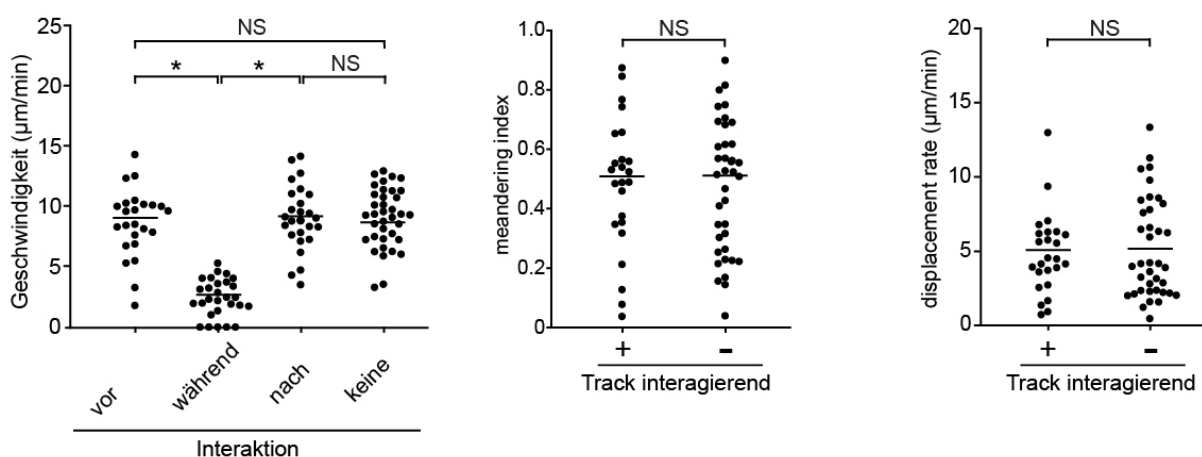
Auch die Ergebnisse der Quantifizierung der Migrationsparameter deuten darauf hin, dass der Einfluss der NG2<sup>+</sup> Perizyten auf myeloide Leukozyten durch MIF vermittelt wird. Entsprechend gibt nach ISO-1 Injektion keine Unterschiede mehr zwischen interagierenden und nicht interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten hinsichtlich Migrationsgeschwindigkeit sowie Direktionalität (Abbildung 52).

Auch finden sich weder im Mean Displacement Plot noch Motility Coefficient (Abbildung 53) signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Schließlich sind in der Heatmap die Unterschiede zwischen den schnellen und langsamen LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten weniger vorhanden (Abbildung 54). Zudem besteht keine Assoziation zu den NG2<sup>+</sup> Perizyten mehr.



**Abbildung 51: Interaktionsdauer und Track Plots von LysM<sup>+</sup> Zellen bei steriler Inflammation nach ISO-1 Injektion**

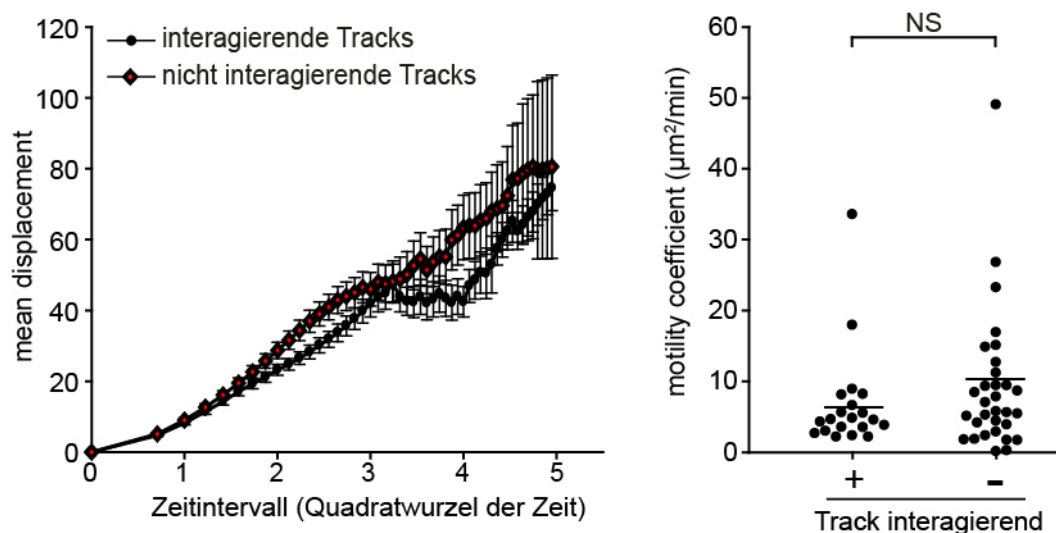
(Links) Verteilung der Interaktionszeiten von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten mit NG2<sup>+</sup> Perizyten nach fMLP und ISO-1 Injektion nach 1.5h. (Mitte & rechts) Trackplot von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten nach fMLP und ISO-1 Injektion nach 1.5h. (Mitte) die Migrationspfade der mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten, (Rechts) die Migrationspfade der nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.



**Abbildung 52: Migrationsprofile von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation nach ISO-1 Injektion**

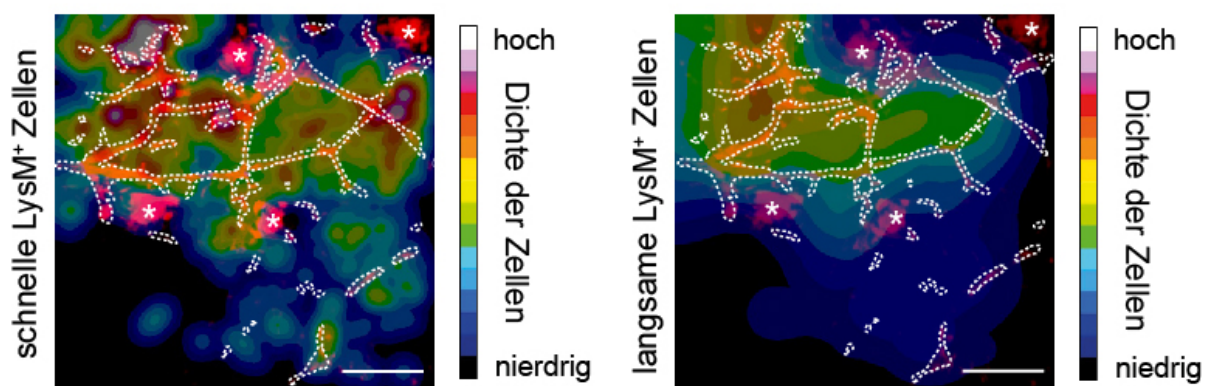
Analysen nach s.c. Injektion von fMLP und ISO-1 nach 1.5h. (Links) Geschwindigkeit von einzelnen LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten vor, während und nach Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten. Geschwindigkeit von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten ohne Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten. Horizontale markiert den Mittelwert. (Mitte)

Meandering Index von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Rechts) Displacement Rate von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.



**Abbildung 53: Mean Displacement Plot und Motility Coefficient von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation nach ISO-1 Injektion**

Analysen nach s.c. Injektion von fMLP und ISO-1 nach 1.5h. (Links) Mean Displacement Plot von Tracks mit Dauer von über 10min von interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. (Rechts) Motility Coefficient von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. Die mit einem NS gekennzeichneten Bereiche weisen keinen signifikanten Unterschied auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.

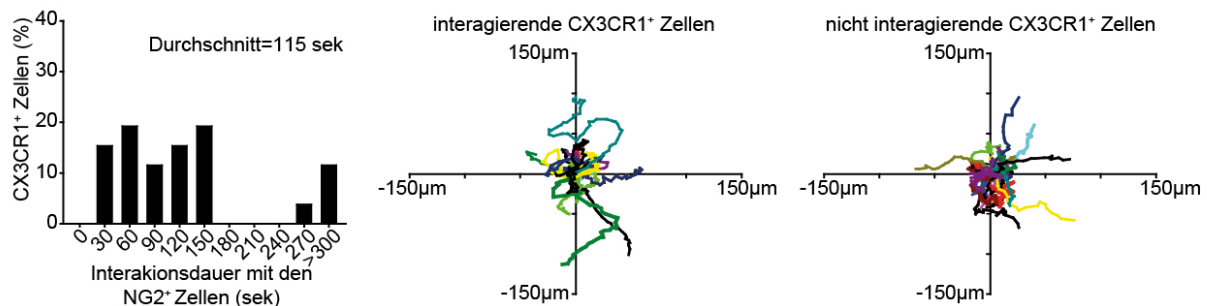


**Abbildung 54: Heatmaps von schnell und langsam migrierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation nach Injektion von ISO-1**



Heatmap der Dichte schnell und langsam migrierender LysM<sup>+</sup> neutrophiler Granulozyten nach s.c. Injektion von fMLP und ISO-1 nach 1.5h. Die Geschwindigkeit wurde mittels automatischem Tracking bestimmt. Links die schnellsten 25% der LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Rechts die langsamsten 25% der LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Maßstab = 100µm. Haarfollikel sind mit „\*“ gekennzeichnet. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

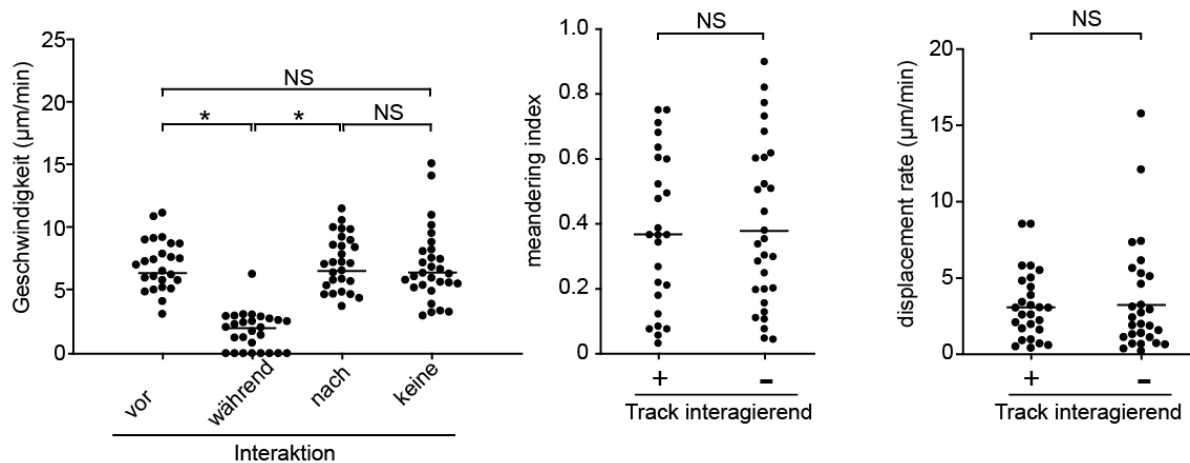
Nachdem gezeigt wurde, dass die Injektion des MIF-Antagonisten ISO-1 die Effekte von NG2<sup>+</sup> Perizyten auf die LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten neutralisiert, wurden die gleichen Experimente mit CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen durchgeführt. Hierzu wurde NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1eGFP Chimären 3.5h nach TNF-α Injektion ISO-1 s.c. in das Ohr injiziert.



**Abbildung 55: Interaktionsdauer und Track Plots von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Zellen bei steriler Inflammation nach ISO-1 Injektion**

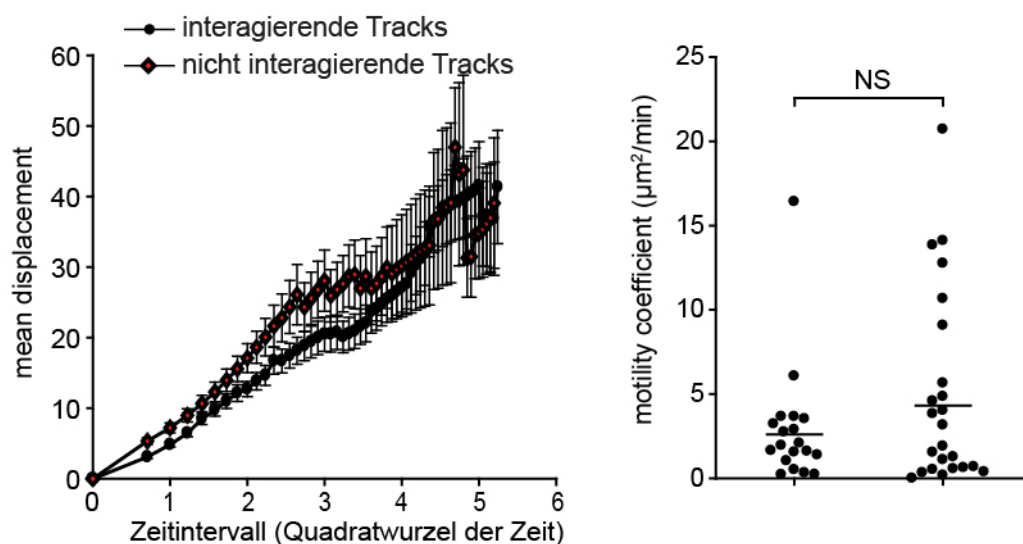
(Links) Verteilung der Interaktionszeiten von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen mit NG2<sup>+</sup> Perizyten nach TNF-α und ISO-1 Injektion nach 3.5h. (Mitte & rechts) Trackplots von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen nach TNF-α Injektion und ISO-1 Injektion. (Mitte) die Migrationspfade der mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. (Rechts) die Migrationspfade der nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.





**Abbildung 56: Migrationsprofile von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen bei steriler Inflammation nach ISO-1 Injektion**

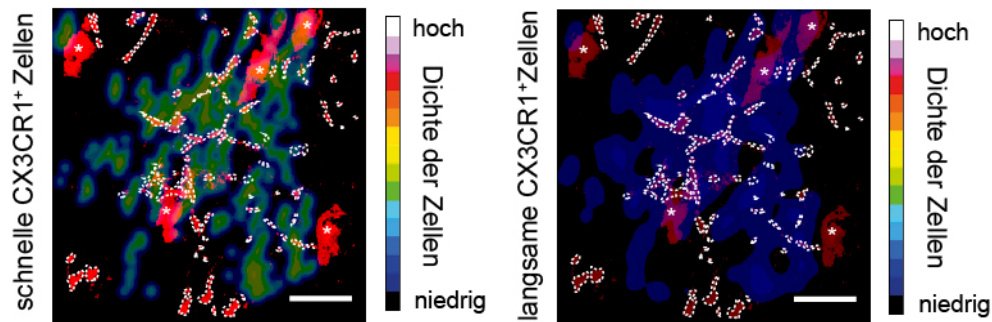
Analysen nach s.c. Injektion von TNF- $\alpha$  und ISO-1 nach 3.5h. (Links) Geschwindigkeit von einzelnen CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen vor, während und nach Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten. Geschwindigkeit von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen ohne Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Mitte) Meandering Index von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Rechts) Displacement Rate von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. Die mit einem NS gekennzeichneten Bereiche weisen keinen signifikanten Unterschied auf. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.



**Abbildung 57: Mean Displacement Plot und Motility Coefficient von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen bei steriler Inflammation nach ISO-1 Injektion**

Analysen nach s.c. Injektion von TNF- $\alpha$  und ISO-1 nach 3.5h. (Links) Mean Displacement Plot von Tracks mit Dauer von über 10min. (Rechts) Motility Coefficient von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup>

Perizyten interagierenden  $CX_3CR1^+$  Makrophagen. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. Die mit einem NS gekennzeichneten Bereiche weisen keinen signifikante Unterschied auf. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.



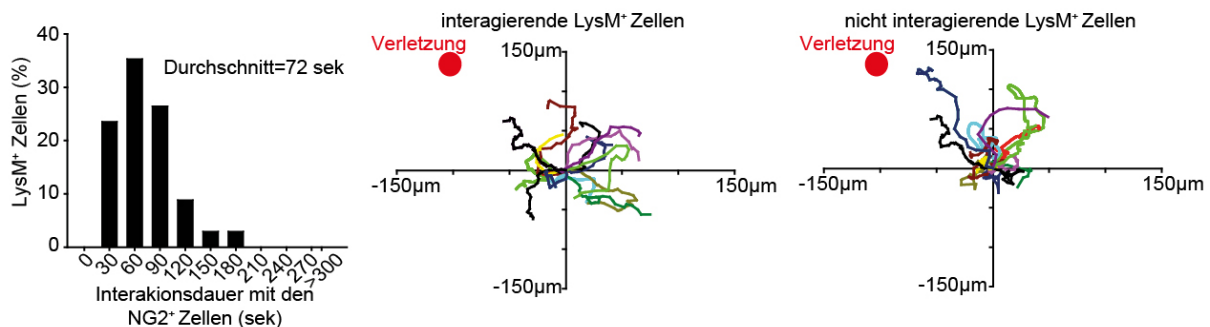
**Abbildung 58: Heatmaps von schnell und langsam migrierenden  $CX_3CR1^+$  Makrophagen bei steriler Inflammation nach Injektion von ISO-1**

Heatmap der Verteilung schnell und langsam migrierenden  $CX_3CR1^+$  Makrophagen nach Injektion von  $TNF-\alpha$  und ISO-1 nach 3.5h. Geschwindigkeit wurde mit Hilfe des automatischen Trackings bestimmt. Links die schnellsten 25%  $CX_3CR1^+$  Makrophagen. Rechts die langsamsten 25% der  $CX_3CR1^+$  Makrophagen. Maßstab = 100µm. Haarfollikel sind mit „\*“ gekennzeichnet. Daten repräsentativ für mindestens  $n=3$  Experimente.

Wie auch bei den  $LysM^+$  neutrophilen Granulozyten kommt es durch Hemmung von MIF durch ISO-1 zu einem Wegfallen der Unterschiede zwischen interagierenden und nicht mit  $NG2^+$  Perizyten interagierenden  $CX_3CR1^+$  Makrophagen.

Damit kommt es durch die Inhibierung von MIF es zu einem Wegfallen des Vorteils der Interaktion und die Migrationsparameter der interagierenden myeloiden Leukozyten entsprachen nach Hemmung von MIF denen der nicht mit  $NG2^+$  Perizyten interagierenden myeloider Leukozyten. Weder besteht die Tendenz der myeloiden Leukozyten zu den  $NG2^+$  Perizyten zu migrieren noch in deren Kompartiment zu migrieren. Die myeloiden Leukozyten die in unmittelbarer Nähe der  $NG2^+$  Perizyten migrieren haben keinen Geschwindigkeitsvorteil mehr zu denen, die frei im Gewebe migrieren. Deutlich wird dies wenn man sich die Geschwindigkeits-Heatmaps (Abbildung 54 und Abbildung 58) nach ISO-1 analysiert und mit denen ohne ISO-1 Injektion vergleicht (Abbildung 38 und Abbildung 42).

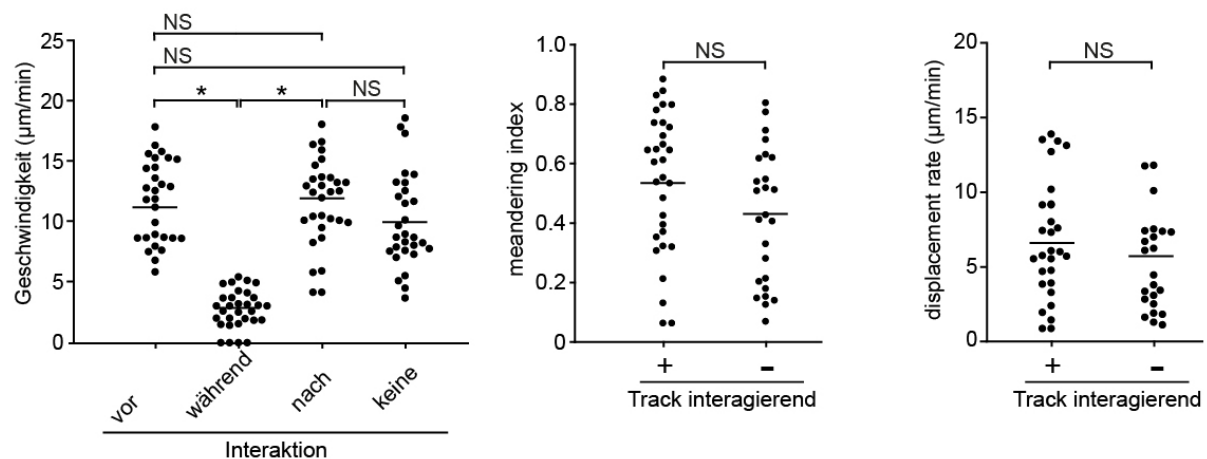
Da der Effekt der NG2<sup>+</sup> Perizyten auf myeloide Leukozyten bei ungerichteter Migration abhängig von MIF war, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob dies auch auf die zielgerichtete Leukozytenmigration bei Laserverletzung zutrifft. Dazu wurde 30min vor Laserverletzung ISO-1 s.c. in das Ohr von NG2DsRed-LysM-eGFP Chimären injiziert, um die interstitielle Migration, nicht aber die Extravasation der Immunzellen zu beeinträchtigen.



**Abbildung 59: Interaktionsdauer und Track Plots von LysM<sup>+</sup> Zellen nach Laserverletzung und ISO-1 Injektion**

(Links) Verteilung der Interaktionszeiten von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten mit NG2<sup>+</sup> Perizyten nach Laserverletzung und ISO-1 Injektion. (Mitte & rechts): Trackplots von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten nach Laserverletzung und ISO-1 Injektion. (Mitte) die Migrationspfade der mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. (Rechts) die Migrationspfade der nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Roter Punkt markiert die Laserverletzung. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

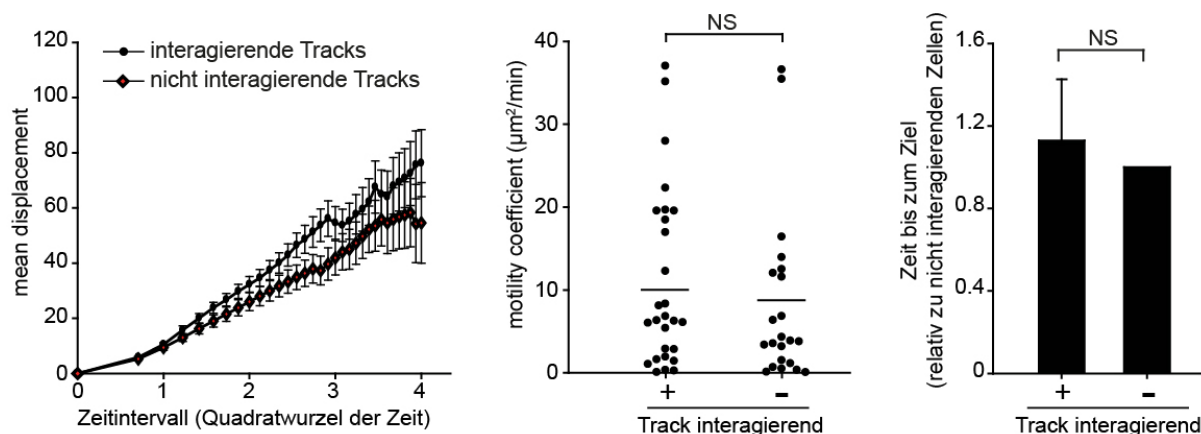
Die Interaktionszeiten sind durchschnittlich im Vergleich zum Experiment ohne ISO-1 Injektion etwas verkürzt, was an dem Wegfall der langen Interaktionen liegt. In den Trackplots (Abbildung 59) weisen die interagierenden und nicht interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten keine Unterschiede auf und die Migration scheint bei beiden zufällig zu sein. Außerdem besteht keine klare Orientierung mehr in Richtung der fokalen sterilen Inflammation. Deutlich wird der Unterschied im Vergleich zum Trackplot ohne ISO-1 Injektion (Abbildung 44).



**Abbildung 60: Migrationsprofile von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten nach Laserverletzung und ISO-1 Injektion.**

Analysen nach Laserverletzung und s.c. Injektion von ISO-1. (Links) Geschwindigkeit von einzelnen LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten vor, während und nach Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten. Geschwindigkeit von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten ohne Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Mitte) Meandering Index von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert.. (Rechts) Displacement Rate von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. Die mit einem NS gekennzeichneten Bereiche weisen keine signifikante Erhöhung auf. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) auf. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

Die interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten sind nun nach Interaktion nicht mehr schneller als vor Interaktion, somit fällt der Geschwindigkeitsvorteil der Interaktion weg. Auch was die Direktionalität und Effizienz der Migration betrifft, gibt es keine Unterschiede mehr zwischen interagierenden und nicht interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten.



**Abbildung 61: Mean Displacement Plot, Motility Coefficient sowie die Dauer bis zum Erreichen der Laserverletzung von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten nach ISO-1 Injektion**

Analysen nach Laserverletzung und s.c. Injektion von ISO-1. (Links) Mean Displacement Plot von Tracks mit Dauer von über 10min von interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. (Mitte) Motility Coefficient von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Rechts) Dauer der Migration von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten zur Laserverletzung nach ISO-1 Injektion. Alle Zellen hatten den gleichen Abstand zur Laserverletzung. Die mit einem NS gekennzeichneten Bereiche weisen keinen signifikanten Unterschied auf. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

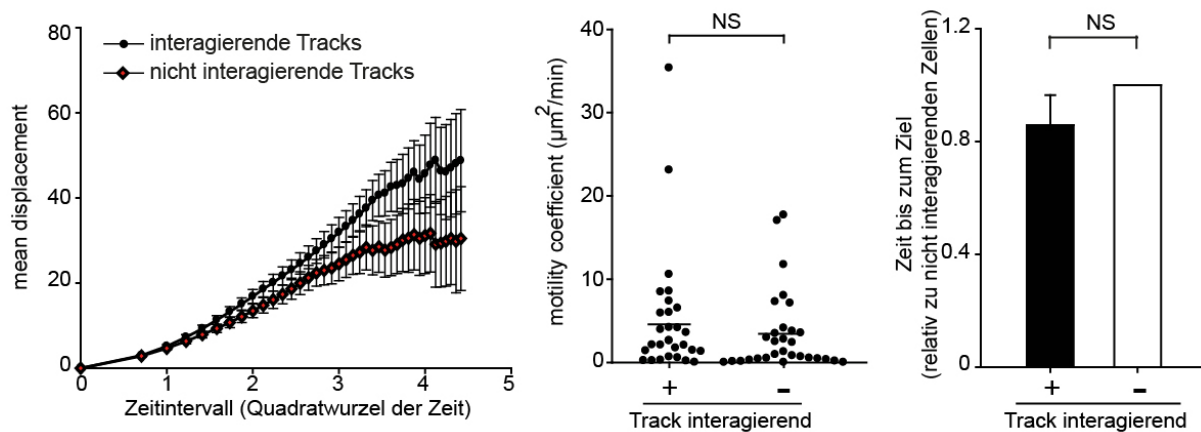
Im Mean Displacement Plot (Abbildung 61) weisen beide Gruppen auf Grund der linearen Steigung ein zufälliges Migrationsmuster auf. Auch besteht kein Vorteil mehr hinsichtlich des gescannten Areal der LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten (Abbildung 61). Die oben beschriebenen wegfallenden Vorteile drücken sich auch in der Zeit in der die LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten die fokale Inflammation erreichen aus. Es besteht kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Antagonisierung von MIF durch ISO-1 Injektion die Vorteile der Interaktion von LysM<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten mit NG2<sup>+</sup> Perizyten bei fokale steriler Inflammation eliminiert, wurden die gleichen Experimente für CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen durchgeführt. Dazu wurde 30min vor Laserverletzung ISO-1 s.c in das Ohr von NG2DsRed-CX<sub>3</sub>CR1eGFP Chimäre injiziert. Auch hier zeigte sich, dass die Antagonisierung von MIF den Migrationsvorteil interagierender Makrophagen neutralisiert und diese sich nun nicht mehr signifikant von den nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden Makrophagen unterscheiden.



Figure 2 consists of three dot plots. The left plot shows locomotor activity (µm/min) for four time points: vor, während, nach, and keine. The y-axis ranges from 0 to 25. The right plot shows the meandering index for two groups: + and -. The y-axis ranges from 0 to 1.0. The right plot shows the displacement rate (µm/min) for two groups: + and -. The y-axis ranges from 0 to 20. All plots show individual data points with mean and SEM bars. Significance levels are indicated by brackets and asterisks.

Analysen nach Laserverletzung und s.c. Injektion von ISO-1. (Links) Geschwindigkeit von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen vor, während und nach Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten. Geschwindigkeit von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen ohne Interaktion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Mitte) Meandering Index von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Rechts) Displacement Rate von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. Die mit einem NS gekennzeichneten Bereiche weisen keine signifikante Erhöhung auf. Die mit einem \* gekennzeichneten Bereiche weisen einen signifikanten Unterschied (p<0,05) auf. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.



**Abbildung 64: Mean Displacement Plot, Motility Coefficient sowie die Dauer bis zum Erreichen der Laserverletzung von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen nach ISO-1 Injektion**

Analysen nach Laserverletzung und s.c. Injektion von ISO-1. (Links) Mean Displacement Plot von Tracks mit Dauer von über 10min von interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. (Mitte) Motility Coefficient von einzelnen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen. Horizontale Linie markiert den Mittelwert. (Rechts) Dauer der Migration von CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> Makrophagen zur Laserverletzung nach ISO-1 Injektion. Alle Zellen hatten den gleichen Abstand zur Laserverletzung. Die mit einem NS gekennzeichneten Bereiche weisen keinen signifikanten Unterschied auf. Daten repräsentativ für mindestens n=3 Experimente.

Zusammenfassend kann für die myeloiden Leukozyten gesagt werden, dass die Injektion von ISO-1 bei fokaler steriler Inflammation die Unterschiede zwischen interagierenden und nicht mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden myeloiden Leukozyten aufhebt. Die interagierenden myeloiden Leukozyten interagieren nach ISO-1 Injektion mit NG2<sup>+</sup> Perizyten zufällig im Gewebe, wie in den Trackplots und Mean Displacement Plots zu sehen ist. Der Vorteil der höheren Geschwindigkeit, den die interagierenden myeloiden Leukozyten haben, fällt nach ISO-1 Injektion weg und auch die Direktionalitätsparameter unterscheiden sich nach ISO-1 Injektion nicht mehr. Aus diesen Änderungen nach ISO-1 Injektion folgt, dass die interagierenden myeloiden Leukozyten nicht mehr den Vorteil haben die fokale sterile Inflammation schneller zu erreichen.

## 6 Diskussion

Für die Immunabwehr des Wirtes ist es von größter Relevanz, dass myeloide Zellen im entzündeten Gewebe ihr Ziel effektiv und schnell erreichen. Die Mechanismen, die die interstitielle Migration orchestrieren, sind jedoch weitestgehend unbekannt.

Bisherige Untersuchungen auf diesem Gebiet beschäftigten sich vor allem mit der Frage, wie die Leukozyten das Gefäß verlassen, um in das entzündete Gewebe überzutreten. Außerdem wurden vor allem die Interaktionen zwischen myeloiden Leukozyten und den Endothelzellen untersucht. Die Frage, ob aber nach dem Verlassen der Venolen eine Interaktion zwischen myeloiden Leukozyten und anderen Zellen während der interstitiellen Migration stattfindet, ist bisher unbeantwortet geblieben. Ebenso ist bisher die Beantwortung der Frage, ob sich an den inflammatorischen Prozessen mesenchymale Zellen und vor allem NG2<sup>+</sup>Perizyten beteiligen, ausgeblieben. Bisher nahm man an, dass myeloide Leukozyten vor allem den Gradienten von im Gewebe löslichen Chemokinen und DAMPs folgen und so zum Entzündungsherd gelangen.

Die vorliegende Arbeit untersucht, welchen Einfluss NG2<sup>+</sup> Perizyten auf die interstitielle Migration myeloider Leukozyten bei steriler Inflammation haben. Dazu wurde *in vitro* und vor allem *in vivo* eine lokale sterile Inflammation erzeugt und diese mittels 2-Photonen Mikroskopie untersucht und ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass bei steriler Inflammation im Interstitium zwischen myeloiden Leukozyten und NG2<sup>+</sup>Perizyten adhäsive Interaktionen stattfinden. Weitere Experimente ergaben, dass diese von dem Adhäsionsmolekül ICAM-1 abhängig sind. Sie kommen durch den von NG2<sup>+</sup>Perizyten ausgehenden chemotaktischen Stimulus zustande. Für diesen Vorgang ist das chemotaktisch wirkende Molekül MIF von entscheidender Bedeutung. Mit Hilfe von MIF erzeugen NG2<sup>+</sup> Perizyten ein Kompartiment, welches myeloide Leukozyten aktiv anzieht, und in dem myeloide Leukozyten migrieren. Analysen zeigten, dass dieses Kompartiment den myeloiden Leukozyten hinsichtlich der Migration einen signifikanten Vorteil verschafft gegenüber Zellen, die außerhalb dieses Kompartiments im interstitiellen Gewebe migrieren. So stellte sich heraus, dass myeloide Leukozyten mittels Interaktion und Migration in dem von NG2<sup>+</sup> Perizyten geschaffenen Kompartiment den Focus einer sterilen Inflammation schneller und effektiver erreichen können, was für die Immunreaktion und Heilung von essentieller Bedeutung ist. Somit wurde hier erstmalig *in vivo* gezeigt, dass NG2<sup>+</sup>Perizyten eine große Rolle bei der interstitiellen Migration spielen und mittels MIF ein Netzwerk bilden, das den myeloiden Leukozyten als



eine Art Autobahn dient, mit deren Hilfe sie schnell und zielgerichtet durch das interstitielle Gewebe migrieren können.

### **6.1 Adhäsive Interaktionen zwischen Perizyten und myeloiden Leukozyten vermittelt durch ICAM-1**

Um zu untersuchen, ob NG2<sup>+</sup> Perizyten auf eine sterile Inflammation reagieren und mit myeloiden Leukozyten interagieren, wurde im Ohr durch s.c. Injektion von fMLP, welches auf neutrophile Granulozyten aktivierend und chemotaktisch wirkt, eine lokale diffuse sterile Inflammation induziert und diese mittels 2-Photonen Mikroskopie untersucht. Um das Migrationverhalten von Monozyten im gleichen Versuchsaufbau zu analysieren wurde TNF- $\alpha$  injiziert. FMLP sowie TNF- $\alpha$  wirken aktivierend und chemotaktisch und fördert so die interstitielle Migration. FMLP wird freigesetzt durch den Untergang von pathogenen Erregern und der Nekrose von körpereigenen Zellen, hier insbesondere aus den Mitochondrien [104, 105]. Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ist ein Molekül, das von gewebsständigen Makrophagen freigesetzt wird, um eine Inflammation zu induzieren. Die Untersuchungen verdeutlichen, dass myeloide Leukozyten unter diesen Bedingungen *in vivo* mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagieren und gezielt in einem aktiven Prozess zu diesen migrieren. Deutlich wird dies durch die Polarisierung der myeloiden Leukozyten sowie das Ausbilden von Pseudopodien in Richtung der NG2<sup>+</sup> Perizyten. Während der Interaktion, die auf Grund des Colocalisationssignals zu erkennen ist, kommt es zu einer massiven Verlangsamung der myeloiden Leukozyten oder sogar zum Arrest. Dies spricht für einen haptotaktischen Stimulus zwischen den NG2<sup>+</sup> Perizyten und den myeloiden Leukozyten[104]. Bei Betrachtung der Geschwindigkeitsprofile der myeloiden Leukozyten ist deutlich, dass es vor der Interaktion zu einer Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit und einer Polarisierung kommt, was für eine chemotaktische Wirkung der NG2<sup>+</sup> Perizyten auf die myeloiden Leukozyten spricht[51]. Dieser chemotaktische Stimulus, den die NG2<sup>+</sup> Perizyten aussenden, scheint auf die, durch die fMLP Injektion, erzeugte sterile Inflammation zurückzuführen sein. Für mesenchymale Stammzellen, die sich zu Perizyten differenzieren können, wurde nachgewiesen, dass diese einen pathogenen Stimulus über TLR detektieren können und neutrophile Granulozyten mittels Expression von inflammatorischen Cytokinen und MIF rekrutieren[33, 106].

Dass NG2<sup>+</sup> Perizyten mit myeloiden Leukozyten interagieren, ist eine neue Erkenntnis. Im Immunsystem ist eine Vielzahl von Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen bekannt, die

zum Teil Parallelen aufweisen. So wurde vor allem für die Zellen des erworbenen Immunsystems gezeigt, dass es u.a. im Lymphknoten zu Interaktionen zwischen fibroretikulären Zellen und T-Zellen kommt [75]. Des Weiteren wurden im Lymphknoten Interaktionen zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen beschrieben[107]. Auch beim angeborenen Immunsystem kommt es zu Interaktionen mit mesenchymalen Zellen. In Experimenten zeigte sich, dass zwischen neutrophilen Granulozyten und mesenchymalen Stammzellen bei Inflammation komplexe Interaktionen in vitro stattfinden[106].

Aber auch bei Perizyten wurden Interaktionen nachgewiesen. Für NG2<sup>-</sup> Perizyten an postkapillären Venolen wurde gezeigt, dass diese Perizytenpopulation, welche nicht auf Kapillaren und Arteriolen zu finden sind, die Transmigration von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut über die Gefäßwand postkapillärer Venolen in das Gewebe im M. cremaster der Maus regulieren. Diese Interaktionen werden unter anderem über das Adhäsionsmolekül ICAM-1 vermittelt [89]. Zusammenfassend zeigt dies, dass NG2<sup>-</sup> Perizyten an der Transmigration beteiligt sind, während hier erstmals gezeigt werden konnte, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten an Arteriolen und Kapillaren chemotaktisch auf interstitielle myeloide Leukozyten wirken und es in diesem Zusammenhang zu Interaktionen kommt.

Für das Immunsystem sind eine Vielzahl von Interaktionen beschreiben. Viele davon werden über ICAM-1 vermittelt - einem Adhäsionsmolekül. Es ist bekannt, dass cerebrale Perizyten ICAM-1 bei Inflammation hochregulieren[87]. Wie schon erwähnt spielt das von NG2<sup>-</sup> Perizyten exprimierte ICAM-1 bei der Transmigration von myeloiden Leukozyten im Cremaster eine wichtige Rolle[89]. Um zu überprüfen ob NG2<sup>+</sup> Perizyten ebenfalls ICAM-1 exprimieren, wurde eine sterile Inflammation induziert und anschließend mittels Whole Mount Staining untersucht. Dort zeigte sich, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten ICAM-1 bei einer Inflammation an ihrer Oberfläche präsentieren und so für eine Interaktion zur Verfügung stellen.

Um die dynamischen Interaktionen zwischen NG2<sup>+</sup> Perizyten und myeloiden Leukozyten genauer zu untersuchen und nach dem gezeigt wurde, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten ICAM-1 exprimieren, sollte durch Inhibierung von ICAM-1 untersucht werden, ob die Interaktionen über ICAM-1 vermittelt werden.

Nach Inhibierung von ICAM-1 kam es zu einer massiven Reduktion und deutlich verkürzten Dauer der Interaktionen zwischen NG2<sup>+</sup> Perizyten und myeloiden Leukozyten. Es kommt

somit zu einer deutlichen Reduzierung haptotaktischer Interaktionen zwischen den Zellen [73]. Insofern kann festgestellt werden, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten mit myeloiden Leukozyten interagieren und dies über das Adhäsionsmolekül ICAM-1 vermittelt wird.

## **6.2 Perizyten wirken chemotaktisch auf myeloide Leukozyten.**

Um den chemotaktischen Einfluss der NG2<sup>+</sup> Perizyten auf die myeloiden Leukozyten zu analysieren, wurde in der Haut eine sterile Inflammation induziert. Nach der Rekrutierung der myeloiden Leukozyten in das entzündete Gewebe kommt es zu einer deutlichen Umverteilung der myeloiden Leukozyten. Diese orientieren sich nach der Transmigration im interstitiellen Gewebe zu den NG2<sup>+</sup> Perizyten, interagieren zum Teil mit diesen und migrieren entlang dem Gerüst der NG2<sup>+</sup> Perizyten. Ähnliche Beobachtungen wurden im Gehirn gemacht. Dort zeigte sich [108], dass bei Inflammation CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Gefäßen migrieren und es so zu einer Akkumulation der T-Zellen um die Gefäße kommt.

Dass Bindegewebe oder anatomischen Strukturen als Leitstrukturen dienen könnten, ist ein mehrfach postulierter Gedanke [109]. Dieser Effekt wird durch Chemokine erzeugt, die sich an der Oberfläche befinden oder sezerniert werden. Im Lymphknoten wurde gezeigt, dass fibroretikuläre Zellen als Leitstruktur dienen, da diese auf ihrer Oberfläche immobilisierte Chemokine präsentieren. Die fibroretikulären Zellen bilden ein Netzwerk, ähnlich eines Straßennetzes, an dem sich die migrierenden Lymphozyten orientieren [108, 110]. Aus diesen Erkenntnissen folgt die Annahme, dass von den NG2<sup>+</sup> Perizyten ein chemotaktischer Reiz auf die myeloiden Leukozyten wirkt und diese auf Grund dieses Reizes zu den NG2<sup>+</sup> Perizyten migrieren und mit diesen interagieren.

Anschließend wurde genauer untersucht, ob MIF einen Einfluss auf die interstitielle Migration hat. MIF ist in diesem Zusammenhang ein sehr interessantes Molekül, da es sowohl auf neutrophile Granulozyten als auch auf Makrophagen wirkt. Es ist ein Hauptregulator des Immunsystems und wirkt chemotaktisch und aktivierend auf myeloide Leukozyten [102]. MIF kann aber auch den Zellarrest vermitteln [111-113]. Beides wurde in dieser Arbeit bei dem Zusammenspiel zwischen myeloiden Leukozyten und NG2<sup>+</sup> Perizyten gezeigt. Die Freisetzung von MIF führt zu einer proinflammatorischen Antwort, die über die Hochregulierung von TLR4 noch gesteigert wird und das Immunsystem verstärkt für DAMPs sensibilisiert [32, 34, 103]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass MIF ein

Hauptregulator des angeborenen Immunsystems ist. Insofern war es naheliegend die Rolle von MIF genauer zu untersuchen.

Zunächst wurde untersucht ob NG2<sup>+</sup> Perizyten MIF bei steriler Inflammation exprimieren und sezernieren. Dafür wurde eine sterile Inflammation induziert und mittels Immunhistochemie gezeigt, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten auf diesen Reiz hin MIF exprimieren und sezernieren, welches bereits im Ruhezustand intrazellulär gespeichert ist. Bisher war vor allem für Makrophagen und Endothelzellen bekannt, dass diese MIF in hohen Dosen exprimieren und sezernieren[37]. Nach dem gezeigt wurde, dass NG2<sup>+</sup> MIF bilden wurde analysiert ob diese Akkumulation von den myeloiden Leukozyten um die NG2<sup>+</sup>Perizyten auf MIF zurückzuführen ist. Dabei zeigte sich, dass eine Inhibierung von MIF ein völlig anderes Verteilungsmuster der myeloiden Leukozyten im Gewebe zur Folge hat. Es kam im Verlauf zu keiner Akkumulation um die NG2<sup>+</sup> Perizyten und die Zellen migrierten diffus im Interstitium verteilt. Diese Ergebnisse zeigen, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten mit Hilfe von MIF ein perivaskuläres Kompartiment erzeugen, zu dem und in dem myeloide Leukozyten migrieren. Für MIF ist bekannt, dass es eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten, welche über CXCR2 und CXCR4 vermittelt wird. Auch wurde es als wichtiger Bestandteil bei einer akuten Inflammation erkannt [37]. Die Erkenntnis jedoch, dass NG2<sup>+</sup>Perizyten über MIF auf myeloide Leukozyten wirken war bisher nicht bekannt.

Die Beobachtungen weisen einige Analogien zu der Arbeit von Siffrin et al[108] auf. Dort wurde gezeigt, dass bei Inflammation im Gehirn ein perivaskulärer Raum entsteht, der reich an Chemokinen ist und in dem sich folglich CD4<sup>+</sup>T-Zellen sammeln. Sind die T-Zellen einmal in diesem Kompartiment, migrieren sie primär in diesem. Die Analyse der Migration ergab, dass diese zufällig bzw. ungerichtet ist, da scheinbar weitere Signale für eine zielgerichtete Migration fehlen[114]. Welche Zellen mittels Chemokinen dieses Kompartiment erschaffen, wurde nicht untersucht. Durch Inhibition des Rezeptors CXCR4 der T-Zellen, blieb die Akkumulation an den Gefäßen aus und die T-Zellen migrierten diffus im Gewebe[115]. Somit wurde gezeigt, dass bei Inflammation im Gehirn ebenfalls ein Kompartiment entsteht, zu dem und in dem die Zellen migrieren. Ebenfalls scheint dieses mittels Chemokinen zu entstehen. So lässt sich erklären, wieso durch Inhibition des Rezeptors CXCR4 die Akkumulation ausbleibt. Über den Rezeptor CXCR4 wird unter anderem auch MIF detektiert[37].

Außerdem kam es bei den durchgeführten Experimenten nach Inhibition von MIF durch ISO-1 zu signifikant weniger Interaktionen. Dafür könnte es zwei Ursachen geben. Einerseits kommt es natürlich auf Grund der fehlenden chemotaktischen Wirkung von MIF zu weniger

räumlichen Kontakten zwischen myeloiden Leukozyten und NG2<sup>+</sup> Perizyten. Aber es konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass MIF die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 erhöht[38]. Eine Inhibierung von MIF führt außerdem bei Inflammation zu einer Reduktion der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen[36]; ein Vorgang, bei dem u.a. ICAM-1 eine wichtige Rolle inne hat. Daher ist es möglich, dass nicht nur der fehlende chemotaktische Stimulus relevant ist, sondern auch eine evtl. verringerte ICAM-1 Expression eine Rolle spielt.

### **6.3 NG2<sup>+</sup> Perizyten fördern die interstitielle Migration myeloider Leukozyten mittels MIF**

Um zu untersuchen wie die Migrationsparameter der myeloiden Leukozyten durch das von NG2<sup>+</sup> Perizyten geschaffene Kompartiment beeinflusst werden, wurden diese genauer analysiert. Die Migrationspfade der sich im Kompartiment befindenden myeloiden Leukozyten haben eine signifikant höhere Direktionalität und bewegen sich signifikant schneller. Dies wurde auch in den Heatmaps visualisiert, wo deutlich zu erkennen ist, dass sich die schnellsten Zellen primär in der unmittelbaren Nähe der NG2<sup>+</sup> Perizyten befinden. Diese Vorteile der interagierenden myeloiden Leukozyten ermöglichen es ihnen ein wesentlich größeres Gewebeareal nach einem Entzündungsherd abzusuchen und so wesentlich effektiver im Dienste des Immunsystems zu arbeiten als Leukozyten die außerhalb dieses Kompartiments migrieren.

Ob dieser Effekt MIF abhängig ist, wurde überprüft in dem MIF mittels ISO-1 inhibiert wurde. Die Heatmaps zeigten, dass es weniger schnell migrierenden myeloide Leukozyten gibt und dass diese diffus im Gewebe verteilt sind. Somit wurde das Kompartiment um NG2<sup>+</sup> Perizyten in dem die myeloiden Leukozyten migrieren durch die Inhibierung von MIF aufgelöst.

Die Möglichkeit, dass Leukozyten im Interstitium Strukturen wie die extrazelluläre Matrix als Leitstrukturen genutzt werden, wurde vermutet [116]. Auch die Möglichkeit eines perivaskulären Kompartiments, dass die Migration erleichtert, wurde postuliert [104].

Die NG2<sup>+</sup> Perizyten scheinen jedoch ein Kompartiment zu erschaffen in dem MIF sezerniert wird und Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 exprimiert werden. Somit erschaffen die NG2<sup>+</sup> Perizyten einen Bereich der scheinbar sehr günstige Eigenschaften hinsichtlich der interstitiellen Migration von myeloiden Leukozyten aufweist. Es wird bei intergrinabhängiger Migration zwischen Haptokinese, zufälliger adhäsiver Migration und Haptotaxis, adhäsive

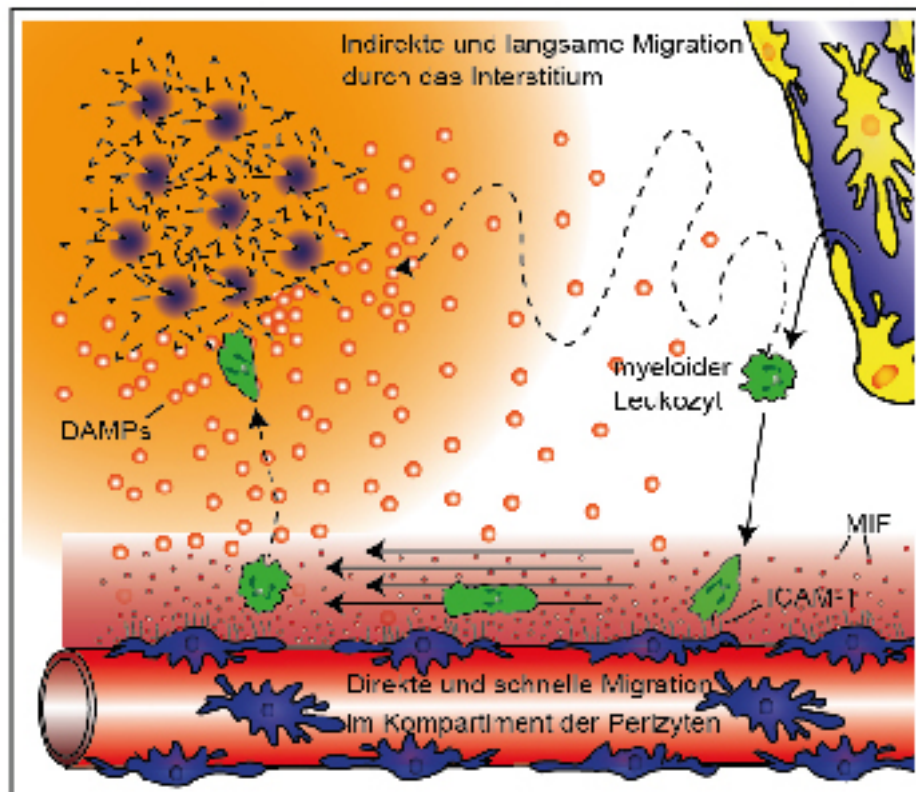
Migration entlang eines Gradienten immobilisierte Liganden differenziert[20, 73]. Im Rahmen der ungerichteten intersitiellen Migration bei fMLP Injektion handelt es sich bei der Leukozyten-Perizyten Interaktion im perivaskulären Kompartiment um Haptokinese, da ein weiterer orientierender Stimulus fehlt[20].

Anschließend wurde untersucht, ob durch die Interaktion ein steriler Inflammationsfocus schneller und effektiver erreicht wird, also ob die Interaktion den myeloiden Leukozyten und damit dem Immunsystem des Wirtes einen Vorteil bietet.

Es zeigte sich, dass die myeloiden Leukozyten auch in dieser Situation mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagieren und diese sowie ihr Kompartiment als Leitstruktur auf dem Weg zum Entzündungsherd nutzen. Die interagierenden myeloiden Leukozyten haben gegenüber den nicht interagierenden und nicht im Kompartiment migrierenden myeloiden Leukozyten überlegene Migrationsparameter sowohl hinsichtlich Geschwindigkeit als auch Direktionalität. Entsprechend haben die mit NG2<sup>+</sup> Perizyten interagierenden myeloiden Leukozyten den Vorteil, dass sie die Nekroszone schneller erreichen

Um zu überprüfen, ob auch hier MIF für diesen Effekt verantwortlich ist, wurde MIF mittels ISO-1 inhibiert. Daraufhin nivellierten sich die Migrationsparameter der interagierenden sowie der nicht interagierenden myeloiden Leukozyten. Außerdem änderte sich auch die Verteilung der myeloiden Leukozyten im Interstitium, es kam zu keiner vermehrten Akkumulation um die NG2<sup>+</sup> Perizyten sondern eher zu einer zufälligen Verteilung im Gewebe. Hinsicht der Verteilung machte Siffrin et al[108] ähnliche Beobachtungen. Dort nahm nach Inhibierung des CXCR4 Rezeptors die Zahl der bei Inflammation perivaskulär migrierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich ab. Somit wurde hier gezeigt, dass das durch MIF erzeugte Kompartiment der NG2<sup>+</sup> Perizyten essentiell ist für eine effektive Migration der myeloiden Leukozyten ist.

In dem Laser-Injury-Modell gibt es primär zwei auf die myeloiden Leukozyten chemotaktisch wirkenden Bereiche, einerseits die Laserverletzung, also die sterile Inflammation und die NG2<sup>+</sup> Perizyten, die auf die sterile Inflammation und die damit verbundenen DAMPs mit der Ausschüttung von MIF reagieren.



**Abbildung 65 NG2<sup>+</sup> Perizyten wirken auf und interagieren mit myeloiden Leukozyten**

NG2<sup>+</sup> wirken über MIF und interagieren über ICAM-1 mit myeloiden Leukozyten und steuern so die Migration der interagierenden Immunzellen und schaffen ein vorteilhaftes Kompartiment mittels MIF (roter Bereich um das Gefäß). Nach dem die Basalmembran NG2-Perizyten (Gelb) passiert sind orientiert sich ein Teil der myeloiden Leukozyten zu den NG2<sup>+</sup> Perizyten, die chemotaktisch auf die myeloiden Leukozyten mittels MIF wirken. Außerdem schaffen diese mittels MIF ein Kompartiment in dem die myeloiden Leukozyten bevorzugt migrieren und vor allem direktere Wege nutzen, um so zur Laserverletzung gelangen. Nach dem sie sich aus dem Kompartiment entfernt haben, orientieren sie sich am DAMP Gradienten im Gewebe. Eigene Darstellung.

Im Rahmen der Interaktion kommt es, wie schon erwähnt, zu einer Aktivierung der myeloiden Leukozyten wodurch es zu einer erhöhten Integrinexprimierung und einer schnellen Migration kommt[51, 117, 118].

Es wurde schon gezeigt, dass myeloide Leukozyten die Fähigkeit haben bestimmte Strukturen des Gewebes zu nutzen, was hier in Form der NG2<sup>+</sup> Perizyten erfolgt, außerdem verfügen Sie über die Fähigkeit zwischen verschiedenen Chemokingradienten zu differenzieren und zu priorisieren[114, 119-121]. Letzteres wird deutlich und erklärt warum die myeloiden Leukozyten nach der Extravasation zunächst zum bzw. im perivaskulären Kompartiment migrieren um dann anschließend in der Nähe der Laserverletzung dieses verlassen und zur Nekrose migrieren. Bezüglich der Priorisierung können die myeloiden Leukozyten wahrscheinlich differenzieren, um was für eine Art von Chemokinsignal es sich handelt: so können Mediatoren, die ein Endziel darstellen andere Signale überschreiben, es besteht also

vermutlich eine Hierarchie der Signale im interstitiellen Raum [114]. Ein derartiger Vorgang wird vermutlich in den Bereichen stattfinden, wo die myeloiden Leukozyten das Kompartiment verlassen und von dort aus zur Laser-Injury migrieren.

Des Weiteren findet auch ein Wechsel der Migrationsart statt: während der Interaktion und zum Teil während der Migration entlang der NG2<sup>+</sup> Perizyten migrieren die myeloiden Leukozyten haptotaktisch, also intergrinabhängig entlang eines Chemokinradienten.. Nach der Ablösung von den NG2<sup>+</sup> Perizyten handelt es sich wieder um intergrinunabhängige Migration, also Chemokin-gesteuerte Migration. Dieser direkte Übergang von haptokinetischer Migration zu Chemokin-gesteuerter Migration findet ohne Geschwindigkeitsverlust statt[122].

Im Rahmen der Interaktion kommt es, wie schon erwähnt, zu einer Aktivierung der myeloiden Leukozyten wodurch es zu einer erhöhten Integrinexprimierung und einer schnellen Migration kommt. Dies begünstigt die haptokinetische Migration im Kompartiment. Außerdem ist bekannt, dass Integrine die Migration entlang der ECM vermitteln und fördern[109]. Zwar sind die NG2<sup>+</sup> Perizyten nicht Teil der ECM, dennoch fungieren sie u.a. wie auch die ECM als Leitstruktur an der sich die myeloiden Zellen orientieren. Ihr Effekt geht jedoch über den der für die ECM hinsichtlich der Migration von Immunzellen gezeigt wurde hinaus. Die NG2<sup>+</sup> Perizyten dienen aber nicht nur als Leitstruktur, sondern sie leiten durch die Expression und Sezernierung von MIF die myeloiden Leukozyten durch das Interstitium in einer sehr effektiven Art und Weise. Außerdem aktivieren die NG2<sup>+</sup> Perizyten die myeloiden Leukozyten und sensibilisieren sie so für verschiedene proinflammatorische Chemokine und so für die effektive Navigation durch das interstitielle Gewebe zum Entzündungsfokus.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Experimente mit Hilfe des Laserverletzungs-Modells sehr gut die Erkenntnisse dieser Arbeit zusammenfassen und verdeutlichen. Die NG2<sup>+</sup> Perizyten reagieren auf einer sterile Inflammation mit der Sezernierung und Präsentation von MIF, womit Sie ein Kompartiment schaffen, in welches die myeloiden Leukozyten migrieren. Dort interagieren sie zum Großteil mit den NG2<sup>+</sup> Perizyten wodurch es zu einer zusätzlichen Aktivierung der myeloiden Leukozyten kommt. Das von den NG2<sup>+</sup> Perizyten geschaffene Kompartiment nutzen die myeloiden Leukozyten als eine Art Autobahn. Diese ermöglicht es Ihnen schneller und direkter in die unmittelbare Nähe des Entzündungsherdes zu migrieren, welchen sie nun unmittelbar nach dem Verlassen des Kompartiments erreichen. Dieser Aspekt verdeutlicht die Relevanz der NG2<sup>+</sup> Perizyten für die interstitielle Leukozytenmigration. Sie sind es, die die Effektivität der Immunabwehr erhöhen



indem sie die myeloiden Leukozyten leiten und somit dem Immunsystem des Wirtes helfen Entzündungsprozesse frühzeitig zu bekämpfen und so eine Genesung begünstigen.

#### **6.4 Ausblick**

Diese Arbeit zeigt, dass kapilläre NG2<sup>+</sup> Perizyten bei steriler Inflammation aktiv die interstitielle Migration der myeloide Leukozyten steuern. Außerdem zeigt sie, welche Wichtigkeit das von NG2<sup>+</sup> Perizyten freigesetzte MIF für die Effektivität der Migration von myeloiden Leukozyten hat. Hier wäre es interessant zu untersuchen welchen Möglichkeiten die Inhibierung von MIF bei der Behandlung von Erkrankungen wie Arteriosklerose oder Autoimmunerkrankungen bietet. Bisher ist der Ansatzpunkt der antiinflammatorischen Therapie primär die Interaktion zwischen Leukozyten und dem Endothel. Jedoch zeigt diese Arbeit, dass es auch lohnenswert wäre neben den Interaktionen zwischen dem Endothel und den Leukozyten auch die Interaktionen zwischen Perizyten und myeloiden Leukozyten zu modulieren. Interessant wäre es auch für zukünftige Arbeiten zu untersuchen, wie sich die Reaktion auf die sterilen Stimuli und von den NG2<sup>+</sup> Perizyten inhibieren bzw. reduzieren lässt. Die beschriebenen Möglichkeiten, könnten antiinflammatorische Therapien verbessern.

## 7 Zusammenfassung

Diese Arbeit identifiziert NG2<sup>+</sup> Perizyten als essentielle Strukturen für die interstitielle Migration von myeloiden Leukozyten bei steriler Inflammation *in vivo*. Sie zeigt außerdem, dass die interstitielle Migration kein rein durch lösliche Chemokine gesteuert Prozess ist. Bis dato wurde weder die Rolle der NG2<sup>+</sup> Perizyten bei steriler Inflammation *in vivo* noch ihr Einfluss auf die interstitielle Leukozytenmigration *in vivo* untersucht.

Es wurde ein Mausmodell verwendet, dass es ermöglicht eine diffuse sterile Inflammation oder eine fokale sterile Nekrose zu induzieren und diese mit Hilfe von 2-Photonen Mikroskopie darzustellen. In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass es *in vivo* bei steriler Inflammation zu Interaktionen, zwischen NG2<sup>+</sup> Perizyten und myeloiden Leukozyten kommt. Diese Interaktionen werden durch ICAM-1 vermittelt, welches als Reaktion auf die sterile Inflammation von den NG2<sup>+</sup> Perizyten exprimiert wird. Die Expression von ICAM-1 zeigt sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Bei einer diffusen sterilen Inflammation kommt es zu einer Akkumulation der myeloiden Leukozyten im interstitiellen Gewebe an den kapillären und arteriolären NG2<sup>+</sup> Perizyten und zu dynamischen Interaktionen zwischen den Zellen. In der Analyse der dynamischen Interaktionen wird deutlich, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten sowohl chemotaktisch als auch haptotaktisch auf die myeloiden Leukozyten wirken. Auch bei der fokalen sterilen Inflammation kommt es zu Interaktionen zwischen myeloiden Leukozyten und NG2<sup>+</sup> Perizyten, auch wenn diese kürzer sind, da noch ein weiterer Stimulus in Form des Inflammationsfokus vorliegt. Weiterhin wurde deutlich, dass diese Interaktionen vorteilhaft für die interstitielle Migration der myeloiden Leukozyten sind. Sie wurden durch die Interaktion aktiviert und migrierten direkter, schneller und somit wesentlich effektiver. *In vivo* und *in vitro* wurde deutlich, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten bei steriler Inflammation das chemotaktisch wirksame Molekül MIF speichern, sezernieren und oberflächlich präsentieren. *In vivo* wurde deutlich, dass das von den NG2<sup>+</sup> Perizyten freigesetzte MIF essentiell ist für eine effektive und schnelle Navigation der myeloiden Leukozyten zu einer fokalen sterilen Inflammation. NG2<sup>+</sup> Perizyten nehmen also eine zentrale Rolle bei der interstitiellen Migration von myeloiden Leukozyten bei steriler Inflammation ein.

Diese Arbeit veranschaulicht und definiert die Relevanz der NG2<sup>+</sup> Perizyten bei steriler Inflammation. Sie zeigt, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten aktiv bei der Modulation der Immunantwort als Folge einer sterilen Inflammation partizipieren. Außerdem wurde das Wissen hinsichtlich der Mechanismen und relevanten Faktoren der interstitiellen Migration von myeloiden Leukozyten erweitert.

## 8 Summary

This Thesis identifies NG2<sup>+</sup>pericytes as essential structures for interstitial leukocyte trafficking during sterile inflammation. It shows that the trafficking is orchestrated by more than just soluble chemokines.

A mouse model was established to visualize via 2-Photon microscopy sterile inflammation and induce a focal sterile necrosis in the skin of the ear. The *in vivo* results show, that there are dynamic interactions between NG2<sup>+</sup>pericytes and myeloid leukocytes. Those interactions are mediated by ICAM-1 which is expressed and upregulated by NG2<sup>+</sup>pericytes after sensing a sterile inflammation.

A diffuse sterile inflammation induces myeloid leukocytes to accumulate along capillary NG2<sup>+</sup>pericytes and to interact with them. The analysis of the dynamic interactions between myeloid leukocytes and NG2<sup>+</sup>pericytes shows that the NG2<sup>+</sup>pericytes attract the myeloid leukocytes. In addition, there are chemotactic and haptotactic interactions between them. After inducing a focal sterile necrosis there are as well haptotactic and chemotactic interactions between NG2<sup>+</sup>pericytes and myeloid leukocytes. Though they are much shorter due to the fact that there is an additional local inflammatory stimulus. Furthermore, it showed that these interactions are beneficial for the myeloid leukocyte trafficking. The myeloid leukocytes are activated by the interaction, therefore migrate faster and in a more directional manner, consequently being much more effective. It became clear *in vivo* and *in vitro* that during sterile inflammation NG2<sup>+</sup>pericytes express and secrete MIF, a chemotactic molecule. MIF secreted by NG2<sup>+</sup>pericytes is required *in vivo* for the guidance and establishing migratory cues that provide myeloid leukocytes with the ability to effectively reach a focal sterile inflammation in the interstitial tissue.

Hence NG2<sup>+</sup>pericytes are vital for the interstitial myeloid leukocyte trafficking during sterile inflammation.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

2-PM	2-Photonen Mikroskopie
A.	Arteria (lat.)
APC	Antigen präsentierende Zellen
ATP	Adenosin- Tri-Phosphat
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
DAMPs	Danger Associated Molecular Patterns
DANN	Desoxyribonucleic Acid
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
ECM	Extra celluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fa.	Firma
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FPR1	fMet-Leu-Phe Receptor 1
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HMGB1	High Mobility Group Protein B1
HSP	Heat Shock Protein
ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IL	Interleukin
ISO-1	Isotyp-1
IVC	individually Ventilated Cages
LFA-1	Lymphocyte function-associated Antigen 1
LPS	Lipopolysaccharide
LTB4	Leukotrien B4
LysM	Lysozym M

MAC	Membrane Attack Complex
MDP	Mean Displacement Plot
MHC1	Major Histocompatibility Complex
Mhz	Megahertz
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
min.	Minuten
mm	Milimeter
NaCl	Natriumchlorid
NG2	Neuron-Glia Antigen 2
nm	Nanometer
°C	Grad Celsius
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PPD	p-Phenylendiamine
PPR	Pattern Recognition Rezeptor
PSGL	P-Selektin Glykoprotein Ligand
rpm	Rotationen pro Minute
s.c.	Subkutan
SIRS	systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
Sek.	Sekunde
SHG	Second Harmonic Generation
SMA	smooth muscle actin
TGF	Tumor growth Faktor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
V.	Vena (lat.)
VCAM	Vascular cell adhesion Protein
VEGF	Vascular endothelial growth Faktor
VLA	Very Late Antigen
z.B.	zum Beispiel
μm	Mikrometer

$\mu\text{m} / \text{sek}$ 

Mikrometer pro Sekunde

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der Induktion einer sterilen Inflammation .....	4
Abbildung 2: Chemokine und ihre Zielzellen.....	6
Abbildung 3: Aktivierung des Immunsystems über DAMPs und ihre Wirkung auf die Gefäße .....	8
Abbildung 4 Adhäsionskaskade.....	11
Abbildung 5: Migrationsarten von Leukozyten .....	13
Abbildung 6: Immobilisierte Chemokine und lösliche Chemokine und ihr Einfluss auf interstitielle Migration .....	14
Abbildung 7: Theorie des perivaskulären Raums .....	15
Abbildung 8: Stokes Shift .....	25
Abbildung 9: Jablonski Schema.....	26
Abbildung 10: Vergleich von Fluoreszenz Mikroskopen .....	27
Abbildung 11 A.Femoralis Katheter.....	31
Abbildung 12: Ohr einer Maus in der Vorrichtung für die 2-Photonen Mikroskopie .....	31
Abbildung 13 Unterschied zwischen Displacement und Track Length bei der Migration von Immunzellen .....	36
Abbildung 14: Mean Displacement Plot Schema und Berechnung .....	38
Abbildung 15: Lokalisation der NG2 <sup>+</sup> Perizyten in vivo .....	41
Abbildung 16: Migration und Colocalization eines Makrophagen nach Induktion einer sterilen Inflammation .....	42
Abbildung 17: Interaktion von einem LysM <sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten mit einem NG2 <sup>+</sup> Perizyten bei steriler Inflammation.....	43
Abbildung 18: Interstitielle Migration von myeloiden Leukozyten und ihrer Migrationsprofile .....	45
Abbildung 19: Interaktionsdauer von myeloiden Leukozyten bei steriler Inflammation.....	46
Abbildung 20: Expression von ICAM-1 von NG2 <sup>+</sup> Perizyten.....	47
Abbildung 21: Einfluss von anti-ICAM-1 Antikörpern auf die Interaktion zwischen myeloiden Leukozyten und NG2 <sup>+</sup> Perizyten.....	48
Abbildung 22: Interstitielle Migration von myeloiden Leukozyten bei steriler Inflammation mit Interaktion mit NG2 <sup>+</sup> Perizyten und ihre Migrationspfade .....	49
Abbildung 23: Ausbildung von Pseudopodien von myeloiden Leukozyten in Richtung von NG2 <sup>+</sup> Perizyten .....	50

Abbildung 24: Heatmap von LysM <sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten nach fMLP Injektion .....	51
Abbildung 25: Overlap Coefficient von LysMeGFP Zellen und NG2dsRed Zellen nach fMLP Injektion .....	52
Abbildung 26: Abstand zwischen LysM <sup>+</sup> Zellen und NG2 <sup>+</sup> Perizyten .....	53
Abbildung 27: Heatmap von CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Makrophagen nach TNF- $\alpha$ Injektion .....	54
Abbildung 28: Overlap Coefficient von CX <sub>3</sub> CR1 eGFP Zellen und NG2dsRed Zellen nach TNF- $\alpha$ Injektion .....	54
Abbildung 29: Abstand zwischen CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Zellen und NG2 <sup>+</sup> Perizyten .....	55
Abbildung 30: Immunfluoreszenz im Ohr einer NG2DsRed Maus .....	56
Abbildung 31: Vergleich der Heatmaps von LysM <sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation bei Injektion von ISO-1 .....	57
Abbildung 32: Overlap Coefficient und Kontakte von LysM <sup>+</sup> Zellen mit NG2 <sup>+</sup> Zellen nach ISO-1 Injektion. ....	58
Abbildung 33: Vergleich der Heatmaps von CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Makrophagen bei steriler Inflammation bei Injektion von ISO-1 .....	59
Abbildung 34: Overlap Coefficient und Kontakte von CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Zellen mit NG2 <sup>+</sup> Zellen nach ISO-1 Injektion. ....	60
Abbildung 35: Trackplot von LysM <sup>+</sup> Zellen bei steriler Inflammation .....	61
Abbildung 36: Migrationsprofile von LysM <sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation .....	62
Abbildung 37: Mean Displacement Plot und Motility Coefficient von LysM <sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation .....	63
Abbildung 38: Heatmaps von schnell und langsam migrierenden LysM <sup>+</sup> Zellen bei steriler Inflammation .....	64
Abbildung 39: Trackplot CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Zellen bei steriler Inflammation .....	65
Abbildung 40: Migrationsprofile von CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Makrophagen bei steriler Inflammation .....	65
Abbildung 41: Mean Displacement Plot und Motility Coefficient von CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Makrophagen bei steriler Inflammation .....	66
Abbildung 42: Heatmaps von schnell und langsam migrierenden CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Makrophagen bei steriler Inflammation .....	67
Abbildung 43: Laser Injury LysM <sup>+</sup> neutrophile Granulozyten .....	69
Abbildung 44: Interaktionsdauer und Track Plots von LysM <sup>+</sup> Zellen bei Laserverletzung .....	70
Abbildung 45: Migrationsprofile von LysM <sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bei Laserverletzung .....	70



Abbildung 46: Mean Displacement Plot, Motility Coefficient sowie die Dauer bis zum Erreichen der Laserverletzung von LysM <sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten. ....	71
Abbildung 47: Laser Injury CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Makrophagen .....	73
Abbildung 49: Interaktionsdauer und Track Plots von CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Zellen bei Laserverletzung. ....	73
Abbildung 49: Migrationsprofile von CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Makrophagen bei Laserverletzung .....	74
Abbildung 50: Mean Displacement Plot, Motility Coefficient sowie die Dauer bis zum Erreichen der Laserverletzung von CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Makrophagen.....	74
Abbildung 51: Interaktionsdauer und Track Plots von LysM <sup>+</sup> Zellen bei steriler Inflammation nach ISO-1 Injektion.....	76
Abbildung 52: Migrationsprofile von LysM <sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation nach ISO-1 Injektion .....	76
Abbildung 53: Mean Displacement Plot und Motility Coefficient von LysM <sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation nach ISO-1 Injektion .....	77
Abbildung 54: Heatmaps von schnell und langsam migrierenden LysM <sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation nach Injektion von ISO-1 .....	77
Abbildung 55: Interaktionsdauer und Track Plots von CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Zellen bei steriler Inflammation nach ISO-1 Injektion .....	78
Abbildung 56: Migrationsprofile von CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Makrophagen bei steriler Inflammation nach ISO-1 Injektion .....	79
Abbildung 57: Mean Displacement Plot und Motility Coefficient von CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Makrophagen bei steriler Inflammation nach ISO-1 Injektion .....	79
Abbildung 59: Heatmaps von schnell und langsam migrierenden CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Makrophagen bei steriler Inflammation nach Injektion von ISO-1 .....	80
Abbildung 59: Interaktionsdauer und Track Plots von LysM <sup>+</sup> Zellen nach Laserverletzung und ISO-1 Injektion .....	81
Abbildung 60: Migrationsprofile von LysM <sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten nach Laserverletzung und ISO-1 Injektion. ....	82
Abbildung 61: Mean Displacement Plot, Motility Coefficient sowie die Dauer bis zum Erreichen der Laserverletzung von LysM <sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten nach ISO-1 Injektion .....	83
Abbildung 62: Interaktionsdauer und Track Plots von CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Zellen nach Laserverletzung und ISO-1 Injektion .....	84
Abbildung 63: Migrationsprofile von CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Makrophagen nach Laserverletzung und ISO-1 Injektion .....	84

---

Abbildung 64: Mean Displacement Plot, Motility Coefficient sowie die Dauer bis zum Erreichen der Laserverletzung von CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> Makrophagen nach ISO-1 Injektion .....	85
Abbildung 65 NG2 <sup>+</sup> Perizyten wirken auf und interagieren mit myeloiden Leukozyten.....	93

## **11 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Toll like und NOD Rezeptoren und ihre korrespondierenden sterilen Stimuli .....	3
Tabelle 2: Antikörper für Whole Mount Staining.....	33
Tabelle 3: Konzentrationen der primären und sekundären Antikörper .....	35

## 12 Literaturverzeichnis

1. Chen, G.Y. and G. Nunez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nature reviews. Immunology, 2010. **10**(12): p. 826-37.
2. Kono, H. and K.L. Rock, *How dying cells alert the immune system to danger*. Nature reviews. Immunology, 2008. **8**(4): p. 279-89.
3. Andersson, U., et al., *High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes*. The Journal of experimental medicine, 2000. **192**(4): p. 565-70.
4. Arnould, D., et al., *Mitochondria in innate immunity*. EMBO reports, 2011. **12**(9): p. 901-10.
5. Mariathasan, S., et al., *Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 228-32.
6. Mantovani, A., et al., *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. Nature reviews. Immunology, 2011. **11**(8): p. 519-31.
7. Arancibia, S.A., et al., *Toll-like receptors are key participants in innate immune responses*. Biol Res, 2007. **40**(2): p. 97-112.
8. Beutler, B., et al., *Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 353-89.
9. Zeytun, A., et al., *Induction of cytokines and chemokines by Toll-like receptor signaling: strategies for control of inflammation*. Crit Rev Immunol, 2010. **30**(1): p. 53-67.
10. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
11. Chen, C.J., et al., *Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells*. Nature medicine, 2007. **13**(7): p. 851-6.
12. Massberg, S., et al., *Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases*. Nature medicine, 2010. **16**(8): p. 887-96.
13. Mariathasan, S. and D.M. Monack, *Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 31-40.
14. Drenth, J.P. and J.W. van der Meer, *The inflammasome--a linebacker of innate defense*. N Engl J Med, 2006. **355**(7): p. 730-2.
15. Rollins, B.J., *Chemokines*. Blood, 1997. **90**(3): p. 909-28.
16. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 610-21.
17. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med, 1998. **338**(7): p. 436-45.
18. Rot, A. and U.H. von Andrian, *Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 891-928.
19. Bromley, S.K., T.R. Mempel, and A.D. Luster, *Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 970-80.
20. Schumann, K., et al., *Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 703-13.
21. Fong, A.M., et al., *Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow*. J Exp Med, 1998. **188**(8): p. 1413-9.
22. Haskell, C.A., M.D. Cleary, and I.F. Charo, *Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation*. J Biol Chem, 1999. **274**(15): p. 10053-8.

23. Garton, K.J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 37993-8001.
24. Tsou, C.L., C.A. Haskell, and I.F. Charo, *Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44622-6.
25. Mantovani, A., R. Bonecchi, and M. Locati, *Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(12): p. 907-18.
26. Pelletier, M., A. Micheletti, and M.A. Cassatella, *Modulation of human neutrophil survival and antigen expression by activated CD4+ and CD8+ T cells*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(6): p. 1163-70.
27. Afonso, P.V., et al., *LTB4 is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis*. Dev Cell, 2012. **22**(5): p. 1079-91.
28. Sarris, M., et al., *Inflammatory chemokines direct and restrict leukocyte migration within live tissues as glycan-bound gradients*. Curr Biol, 2012. **22**(24): p. 2375-82.
29. Woodfin, A., et al., *Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1*. Blood, 2009. **113**(24): p. 6246-57.
30. Woodfin, A., M.B. Voisin, and S. Nourshargh, *Recent developments and complexities in neutrophil transmigration*. Curr Opin Hematol, 2010. **17**(1): p. 9-17.
31. Baugh, J.A. and R. Bucala, *Macrophage migration inhibitory factor*. Crit Care Med, 2002. **30**(1 Supp): p. S27-S35.
32. Roger, T., M.P. Glauser, and T. Calandra, *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria*. J Endotoxin Res, 2001. **7**(6): p. 456-60.
33. Calandra, T. and T. Roger, *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 791-800.
34. Roger, T., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4)*. J Endotoxin Res, 2003. **9**(2): p. 119-23.
35. Bacher, M., et al., *An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7849-54.
36. Hoi, A.Y., M.N. Iskander, and E.F. Morand, *Macrophage migration inhibitory factor: a therapeutic target across inflammatory diseases*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2007. **6**(3): p. 183-90.
37. Bernhagen, J., et al., *MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 587-96.
38. Calandra, T. and R. Bucala, *Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system*. Crit Rev Immunol, 1997. **17**(1): p. 77-88.
39. Cheng, Q., et al., *Macrophage migration inhibitory factor increases leukocyte-endothelial interactions in human endothelial cells via promotion of expression of adhesion molecules*. J Immunol, 2010. **185**(2): p. 1238-47.
40. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
41. Majno, G., M. La Gattuta, and T.E. Thompson, *Cellular death and necrosis: chemical, physical and morphologic changes in rat liver*. Virchows Archiv fur pathologische Anatomie und Physiologie und fur klinische Medizin, 1960. **333**: p. 421-65.
42. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-61.

43. Saha, P. and F. Geissmann, *Toward a functional characterization of blood monocytes*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(1): p. 2-4.
44. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
45. Serbina, N.V. and E.G. Pamer, *Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 311-7.
46. Auffray, C., et al., *Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior*. Science, 2007. **317**(5838): p. 666-70.
47. Imhof, B.A. and M. Aurrand-Lions, *Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 432-44.
48. Nourshargh, S., P.L. Hordijk, and M. Sixt, *Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(5): p. 366-78.
49. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 657-70.
50. Scapini, P., et al., *Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19*. European journal of immunology, 2001. **31**(7): p. 1981-8.
51. Ng, L.G., et al., *Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(10): p. 2058-68.
52. Sadik, C.D., N.D. Kim, and A.D. Luster, *Neutrophils cascading their way to inflammation*. Trends in immunology, 2011. **32**(10): p. 452-60.
53. Soehnlein, O. and L. Lindbom, *Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation*. Nature reviews. Immunology, 2010. **10**(6): p. 427-39.
54. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nature reviews. Immunology, 2007. **7**(9): p. 678-89.
55. Yago, T., et al., *E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin alphaLbeta2-mediated slow leukocyte rolling*. Blood, 2010. **116**(3): p. 485-94.
56. Mueller, H., et al., *Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling phospholipase C (PLC) gamma2 and PI3Kgamma pathways*. Blood, 2010. **115**(15): p. 3118-27.
57. Engelhardt, B. and H. Wolburg, *Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?* European journal of immunology, 2004. **34**(11): p. 2955-63.
58. Vestweber, D., et al., *Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player*. Trends in cell biology, 2009. **19**(1): p. 8-15.
59. Williams, M.R., et al., *Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium*. Trends in immunology, 2011. **32**(10): p. 461-9.
60. Taekema-Roelvink, M.E., et al., *Proteinase 3 enhances endothelial monocyte chemoattractant protein-1 production and induces increased adhesion of neutrophils to endothelial cells by upregulating intercellular cell adhesion molecule-1*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2001. **12**(5): p. 932-40.
61. Soehnlein, O., et al., *Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1461-71.
62. Kasama, T., et al., *Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha*. The Journal of experimental medicine, 1993. **178**(1): p. 63-72.

63. Bournazou, I., et al., *Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin*. The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(1): p. 20-32.
64. Truman, L.A., et al., *CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis*. Blood, 2008. **112**(13): p. 5026-36.
65. Voll, R.E., et al., *Immunosuppressive effects of apoptotic cells*. Nature, 1997. **390**(6658): p. 350-1.
66. Freire-de-Lima, C.G., et al., *Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages*. Nature, 2000. **403**(6766): p. 199-203.
67. Friedl, P. and B. Weigelin, *Interstitial leukocyte migration and immune function*. Nature immunology, 2008. **9**(9): p. 960-9.
68. Miller, M.J., et al., *T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(4): p. 998-1003.
69. Miller, M.J., et al., *Imaging the single cell dynamics of CD4<sup>+</sup> T cell activation by dendritic cells in lymph nodes*. The Journal of experimental medicine, 2004. **200**(7): p. 847-56.
70. Mackay, C.R., *Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies*. Nature immunology, 2008. **9**(9): p. 988-98.
71. Friedl, P. and E.B. Brocker, *T cell migration in three-dimensional extracellular matrix: guidance by polarity and sensations*. Developmental immunology, 2000. **7**(2-4): p. 249-66.
72. Dustin, M.L., et al., *Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(8): p. 3909-13.
73. Friedl, P., S. Borgmann, and E.B. Brocker, *Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement*. Journal of leukocyte biology, 2001. **70**(4): p. 491-509.
74. Lammermann, T., et al., *Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 51-5.
75. Bajenoff, M., et al., *Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 989-1001.
76. Lindquist, R.L., et al., *Visualizing dendritic cell networks in vivo*. Nature immunology, 2004. **5**(12): p. 1243-50.
77. Armulik, A., et al., *Pericytes regulate the blood-brain barrier*. Nature, 2010. **468**(7323): p. 557-61.
78. Sims, D.E., *The pericyte--a review*. Tissue & cell, 1986. **18**(2): p. 153-74.
79. Bergers, G. and S. Song, *The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance*. Neuro-oncology, 2005. **7**(4): p. 452-64.
80. DeRuiter, M.C., et al., *Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro*. Circ Res, 1997. **80**(4): p. 444-51.
81. Egginton, S., et al., *In vivo pericyte-endothelial cell interaction during angiogenesis in adult cardiac and skeletal muscle*. Microvasc Res, 1996. **51**(2): p. 213-28.
82. Collett, G.D. and A.E. Canfield, *Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification*. Circ Res, 2005. **96**(9): p. 930-8.
83. Nehls, V. and D. Drenckhahn, *The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle?* Histochemistry, 1993. **99**(1): p. 1-12.
84. Nehls, V., K. Denzer, and D. Drenckhahn, *Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ*. Cell and tissue research, 1992. **270**(3): p. 469-74.

85. Murfee, W.L., T.C. Skalak, and S.M. Peirce, *Differential arterial/venous expression of NG2 proteoglycan in perivascular cells along microvessels: identifying a venule-specific phenotype*. Microcirculation, 2005. **12**(2): p. 151-60.
86. Daneman, R., et al., *Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis*. Nature, 2010. **468**(7323): p. 562-6.
87. Balabanov, R., T. Beaumont, and P. Dore-Duffy, *Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes*. Journal of neuroscience research, 1999. **55**(5): p. 578-87.
88. Verbeek, M.M., et al., *T lymphocyte adhesion to human brain pericytes is mediated via very late antigen-4/vascular cell adhesion molecule-1 interactions*. Journal of immunology, 1995. **154**(11): p. 5876-84.
89. Proebstl, D., et al., *Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo*. The Journal of experimental medicine, 2012. **209**(6): p. 1219-34.
90. Faust, N., et al., *Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages*. Blood, 2000. **96**(2): p. 719-26.
91. Zhu, X., D.E. Bergles, and A. Nishiyama, *NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes*. Development, 2008. **135**(1): p. 145-57.
92. Heintz, N., *BAC to the future: the use of bac transgenic mice for neuroscience research*. Nature reviews. Neuroscience, 2001. **2**(12): p. 861-70.
93. Friedl, P., et al., *Biological second and third harmonic generation microscopy*. Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.], 2007. **Chapter 4**: p. Unit 4 15.
94. Niesner, R., et al., *The power of single and multibeam two-photon microscopy for high-resolution and high-speed deep tissue and intravital imaging*. Biophysical journal, 2007. **93**(7): p. 2519-29.
95. Diaspro, A., et al., *Multi-photon excitation microscopy*. Biomedical engineering online, 2006. **5**: p. 36.
96. Helmchen, F. and W. Denk, *Deep tissue two-photon microscopy*. Nature methods, 2005. **2**(12): p. 932-40.
97. So, P.T., et al., *Two-photon excitation fluorescence microscopy*. Annual review of biomedical engineering, 2000. **2**: p. 399-429.
98. Germain, R.N., et al., *Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise*. Nature reviews. Immunology, 2006. **6**(7): p. 497-507.
99. Cox, G. and E. Kable, *Second-harmonic imaging of collagen*. Methods in molecular biology, 2006. **319**: p. 15-35.
100. Beltman, J.B., A.F. Maree, and R.J. de Boer, *Analysing immune cell migration*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 789-98.
101. Sumen, C., et al., *Intravital microscopy: visualizing immunity in context*. Immunity, 2004. **21**(3): p. 315-29.
102. Renner, P., T. Roger, and T. Calandra, *Macrophage migration inhibitory factor: gene polymorphisms and susceptibility to inflammatory diseases*. Clin Infect Dis, 2005. **41 Suppl 7**: p. S513-9.
103. Roger, T., et al., *MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4*. Nature, 2001. **414**(6866): p. 920-4.
104. Friedl, P. and B. Weigelin, *Interstitial leukocyte migration and immune function*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 960-9.
105. Sorokin, L., *The impact of the extracellular matrix on inflammation*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(10): p. 712-23.



106. Brandau, S., et al., *Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(5): p. 1005-15.
107. Mempel, T.R., S.E. Henrickson, and U.H. Von Andrian, *T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases*. Nature, 2004. **427**(6970): p. 154-9.
108. Siffrin, V., et al., *Differential immune cell dynamics in the CNS cause CD4+ T cell compartmentalization*. Brain, 2009. **132**(Pt 5): p. 1247-58.
109. Plotnikov, S.V. and C.M. Waterman, *Guiding cell migration by tugging*. Curr Opin Cell Biol, 2013. **25**(5): p. 619-26.
110. Bajenoff, M., N. Glaichenhaus, and R.N. Germain, *Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 3947-54.
111. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
112. Laudanna, C. and R. Alon, *Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes*. Thromb Haemost, 2006. **95**(1): p. 5-11.
113. Tedgui, A. and Z. Mallat, *Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways*. Physiol Rev, 2006. **86**(2): p. 515-81.
114. Foxman, E.F., J.J. Campbell, and E.C. Butcher, *Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis*. J Cell Biol, 1997. **139**(5): p. 1349-60.
115. Gunzer, M., et al., *Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential*. Immunity, 2000. **13**(3): p. 323-32.
116. Weninger, W., M. Biro, and R. Jain, *Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(4): p. 232-46.
117. Nourshargh, S., *L2. Neutrophil transmigration in vivo: mechanisms, dynamics and contribution to dissemination of systemic inflammation*. Presse Med, 2013. **42**(4 Pt 2): p. 498-9.
118. Nourshargh, S. and F.M. Marelli-Berg, *Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function*. Trends Immunol, 2005. **26**(3): p. 157-65.
119. Deng, Q. and A. Huttenlocher, *Leukocyte migration from a fish eye's view*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 17): p. 3949-56.
120. Mathias, J.R., et al., *Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(6): p. 1281-8.
121. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
122. Renkawitz, J., et al., *Adaptive force transmission in amoeboid cell migration*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(12): p. 1438-43.

### 13 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Steffen Massberg dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat in einer so guten und hochversierten Arbeitsgruppe meine Arbeit zu machen. Neben meiner Arbeit hatte ich so die Möglichkeit von dem dort einmaligen Wissen und „know-how“ zu profitieren. Außerdem möchte ich mich für die Hilfestellungen, die Motivation sowie das Engagement beim Erstellen dieser Arbeit bedanken

Herzlichst möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Konstantin Stark bedanken. Dieser ermöglichte mir mit der hoch interessanten Fragestellung die Chance diese Arbeit zu realisieren. Des Weiteren war er stets hochengagiert hinsichtlich meiner Betreuung und war stets bereit mit freundschaftlichem Rat zu helfen. Sein breites Wissen, sein Interesse sein Engagement und seine Geduld beim Einarbeiten in die Methoden haben es mir erst ermöglicht diese Arbeit zu verfassen.

Auch möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe, u.a. Dr. Marie-Luise von Brühl, Dr. Sue Chandraratne und Raffaele Coletti bedanken für ihre fachliche und moralische Unterstützung, sowie der angenehmen Atmosphäre. Ein besonderer Dank gebührt Dr. Annekathrin Eckart, die mir sowohl freundschaftlich als fachlich geholfen hat und für eine sehr gute Zusammenarbeit gesorgt hat.

Ich möchte meiner Familie, speziell meinen Eltern danken, die mir dieses Studium und die Promotion ermöglicht haben und mich stets gefördert und unterstützt haben. Auch bei meiner Verlobten Julia Specht möchte ich mich bedanken, die mich immer wieder motiviert und unterstützt hat.

# Eidesstattliche Versicherung

Haidari, Selgai

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema  
**Perizyten als Leitstrukturen der interstitiellen Leukozytenmigration bei steriler  
Inflammation**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und  
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als  
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle  
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in  
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades  
eingereicht wurde.

München, 14.Nov.2016

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand